



Interaction toxine-cellule étudiée par imagerie individuelle de nanoparticules d'oxyde fluorescentes.

Didier Casanova

► To cite this version:

Didier Casanova. Interaction toxine-cellule étudiée par imagerie individuelle de nanoparticules d'oxyde fluorescentes.. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Polytechnique X, 2008. Français. NNT: . pastel-00003731

HAL Id: pastel-00003731

<https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00003731>

Submitted on 27 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE

Spécialité : Physique

par

Didier Casanova

Nanoparticules d'oxyde : développements et applications comme sondes biologiques

Soutenue le 11 janvier 2008 devant le jury composé de

| | |
|--|---------------------|
| Mr Claude Boccara, ESPCI | Président |
| Mr Maxime Dahan, ENS | Rapporteur |
| Mr Brahim Lounis, Université de Bordeaux | Rapporteur |
| Mme Claire Dane, DGA | Examinatrice |
| Mr Thierry Gacoin, Ecole Polytechnique | Examineur |
| Mme Antigoni Alexandrou, Ecole Polytechnique | Directrice de thèse |

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | 7 |
| 1 Introduction | 9 |
| 1.1 Sondes fluorescentes en biologie cellulaire | 9 |
| 1.1.1 Les fluorophores organiques | 10 |
| 1.1.2 Les protéines fluorescentes | 11 |
| 1.1.3 Les nanocristaux semiconducteurs | 12 |
| 1.2 Les nanoparticules d'oxyde dopées par des ions lanthanides | 13 |
| 1.2.1 Synthèse des nanoparticules | 14 |
| 1.2.2 Propriétés structurales | 15 |
| 1.2.3 Propriétés optiques | 17 |
| 1.3 L'approche molécules individuelles | 19 |
| 1.3.1 Ensemble de molécules versus molécules individuelles | 19 |
| 1.3.2 Montage expérimental | 20 |
| 1.4 Problématiques étudiées | 21 |
| 2 Détermination optique de la taille des nanoparticules | 25 |
| 2.1 Enjeux et objectifs | 25 |
| 2.2 NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$: un ensemble de systèmes à trois niveaux équivalents | 29 |
| 2.2.1 Le système à trois niveaux | 29 |
| 2.2.2 Variabilité du taux d'excitation ω | 32 |
| 2.2.3 Variabilité du rendement quantique Q | 33 |
| 2.2.4 Conclusions | 42 |
| 2.3 Distribution de la taille des NPs calculée par voie optique | 43 |
| 2.3.1 Traitement d'images | 43 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.3.2 | Comparatif des distributions obtenues par MET et par voie optique . . | 45 |
| 2.4 | Conclusions | 48 |
| 3 | Photophysique des nanoparticules de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$ | 49 |
| 3.1 | Introduction | 49 |
| 3.2 | Etude du photoblanchiment des nanoparticules de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$ | 53 |
| 3.2.1 | Propriétés générales | 53 |
| 3.2.2 | Photo-réduction des nanoparticules | 66 |
| 3.2.3 | Correspondance position-dynamique de photo-réduction | 72 |
| 3.2.4 | Le rôle des défauts cristallins dans la photo-réduction | 76 |
| 3.2.5 | Interprétation du photoblanchiment | 81 |
| 3.3 | Modélisation du photoblanchiment | 87 |
| 3.3.1 | Modèle sans simplifications | 87 |
| 3.3.2 | Simplifications et hypothèses | 90 |
| 3.3.3 | Modèle simplifié sans retour | 92 |
| 3.3.4 | Modèle simplifié avec retour | 104 |
| 3.4 | Conclusions | 104 |
| 4 | Nanoparticules d'oxyde comme donneurs dans les expériences de FRET | 107 |
| 4.1 | Commentaires | 107 |
| 4.2 | Reproduction de la publication | 109 |
| 5 | Fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde | 117 |
| 5.1 | Etat de l'art | 117 |
| 5.1.1 | Présentation des molécules de fonctionnalisation | 117 |
| 5.1.2 | Nature du couplage entre molécules bifonctionnelles et surface des NPs | 118 |
| 5.2 | Enrobage des NPs par une couche polymérique de silice fonctionnalisée | 120 |
| 5.2.1 | Enrobage par de la silice fonctionnalisée en deux étapes | 122 |
| 5.2.2 | Enrobage par de la silice fonctionnalisée en une étape | 125 |
| 5.3 | Couplage des NPs aux protéines : analyse préparatoire | 127 |
| 5.3.1 | Couplage par "cross-linking" | 127 |
| 5.3.2 | Problème de la stabilité colloïdale | 128 |
| 5.4 | Couplage des NPs aux protéines : protocole et résultats | 133 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.4.1 | Protocole de couplage | 134 |
| 5.4.2 | Résultats en terme de stabilité colloïdale et d'efficacité de couplage . . | 137 |
| 5.4.3 | Couplage entre NPs et toxine ε | 141 |
| 5.4.4 | Autres couplages | 143 |
| 5.5 | Quantification du nombre de protéines par NP à l'échelle de la NP unique . . | 144 |
| 5.5.1 | Taille des NPs et nombre moyen de protéines couplées aux NPs | 145 |
| 5.5.2 | Colocalisation des spots NPs et Alexa | 146 |
| 5.5.3 | Estimation du nombre d'Alexa par NP | 147 |
| 5.5.4 | Estimation du nombre de protéines par NP | 149 |
| 5.6 | Conclusions | 152 |
| 6 | Détection de peroxyde d'hydrogène | 153 |
| 6.1 | Introduction | 153 |
| 6.1.1 | Contexte biologique | 154 |
| 6.1.2 | Senseurs à peroxyde d'hydrogène | 156 |
| 6.2 | NPs de $\text{YVO}_4 : \text{Eu}$ comme senseurs à H_2O_2 | 157 |
| 6.2.1 | Expériences d'ensemble | 158 |
| 6.2.2 | Expériences en NPs individuelles | 166 |
| 6.3 | Production de ROS stimulée par l'endothéline-1 | 173 |
| 6.3.1 | Protocole d'introduction des NPs dans les CMLV | 173 |
| 6.3.2 | Résultats expérimentaux | 174 |
| 6.4 | Conclusions | 182 |
| 7 | Suivi de toxines ε individuelles en nanoparticules de $\text{YVO}_4:\text{Eu}$ | 183 |
| 7.1 | Introduction | 183 |
| 7.1.1 | Contexte biologique | 184 |
| 7.1.2 | Technique du suivi de NPs uniques | 189 |
| 7.2 | Suivi de la dynamique membranaire de la toxine ε | 193 |
| 7.2.1 | Couplage des NPs aux toxines ε | 194 |
| 7.2.2 | Préparation des cellules MDCK | 194 |
| 7.2.3 | Dispositif expérimental et précision de la localisation | 195 |
| 7.2.4 | Résultats expérimentaux | 196 |
| 7.3 | Conclusions | 205 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 8 | Conclusions | 207 |
| A | Détermination robuste du nombre de photons émis par NP | 211 |
| A.1 | Création d'une image théorique | 212 |
| A.2 | Présentation du programme de traitement d'images | 215 |
| A.2.1 | Rappel sur le filtrage spatial | 215 |
| A.2.2 | Création du masque binaire | 217 |
| A.2.3 | Soustraction du signal de fond et image finale | 221 |
| A.3 | Efficacité du traitement d'images | 223 |
| A.3.1 | Cas d'un fort niveau de signal de fond | 223 |
| A.3.2 | Cas d'un faible niveau de signal de fond | 225 |
| A.3.3 | Cas d'une distribution de NPs de tailles différentes | 225 |
| B | Difficultés associées au couplage des NPs avec un "cross-linker" | 229 |
| B.1 | Considérations générales sur la réaction entre NPs et "cross-linker" | 229 |
| B.1.1 | Théorie de Smoluchowski et Debye | 229 |
| B.1.2 | Commentaires sur la réaction entre NPs et molécules chargées | 230 |
| B.2 | Réaction d'acylation dans un solvant aqueux ou organique | 232 |
| B.2.1 | Réaction d'acylation dans le 1,4 dioxane | 233 |
| B.2.2 | Réaction d'acylation en solvant aqueux | 240 |
| B.2.3 | Réaction d'acylation entre l'APTES et le BS ³ | 243 |

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, Claude Boccara, Maxime Dahan, Brahim Lounis, Claire Dane et Thierry Gacoin pour s'être penchés longuement sur le cas des nanoparticules d'oxyde.

Je remercie également Jean-Louis Martin, directeur du Laboratoire d'Optique et Biosciences, de m'avoir donné ma chance, pour ses remarques scientifiques et pour ses merveilleuses prises de position. Je voudrais remercier l'ensemble du laboratoire et notamment Emmanuel Beaurepaire pour ses remarques et aides précieuses, Manuel Joffre pour ses questions, Ursula Liebl pour ses réponses, Michel Négrerie pour sa gentillesse, Jean-Marc Sintès et Xavier Solinas pour les choppers et mille autres réalisations...

Je souhaite remercier aussi nos collaborateurs : Pierre-Louis Tharaux, Michel R. Popoff et Blandine Geny pour avoir permis d'appliquer ces nanoparticules au contexte biologique ainsi que Joelle Prunet et Jean-Pierre Férézou pour avoir relu avec attention les divagations d'un physicien au pays des chimistes...

Cette thèse n'aurait tout simplement pas été possible sans les nanoparticules du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée. Je remercie chaleureusement Domitille Giaume, Mélanie Moreau, Geneviève Mialon et Thierry Gacoin pour avoir supporté mes demandes quotidiennes ainsi que Jean-Pierre Boilot pour avoir su entourer de son flegme ces travaux de recherche. Je suis pleinement conscient de ce que je vous dois.

Je voudrais exprimer la plus infinie des gratitude à la personne qui a eu, sans conteste, la plus grande contribution à ces travaux de recherche. Antogni, tu as su, durant ces trois longues années, guider patiemment ma passion et mes emportements. Nous avons pu avoir des discussions scientifiques et non-scientifiques enflammées qui, à mon corps défendant, m'ont fait largement évoluer. En fin de compte, les mots ne suffisent pour te dire combien je te suis reconnaissant. J'espère que je te manquerai autant qu'aux nombreux cendriers de l'école...

Ces années de thèse n'auraient pas eu le même impact si je n'avais pas pu compter quotidiennement sur Grand Corps Malade, le faux socialiste, le boucher des Carpathes, la veuve à bulles et S....ler A.sch V..er. Je ne suis pas prêt d'oublier les soirées du 39 ter.

Enfin, je voudrais canoniser Claire pour me supporter depuis ces si nombreuses années et m'avoir toujours raisonné avec une aisance et une facilité qui me déconcertera toujours et Dany, Phillou, Jacky et Jeannot pour avoir toujours été présents pour moi...

Chapitre 1

Introduction

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB, Ecole polytechnique) sous la direction d'Antigoni Alexandrou. Une des thématiques de ce laboratoire est le développement et l'application dans le domaine de la biologie d'un nouveau type de sondes fluorescentes de taille nanométrique. Ces nanoparticules (NPs) constituées d'une matrice de vanadate d'Yttrium dopée par des ions Europium ($Y_{1-x}Eu_xVO_4$) sont détectables individuellement en microscopie optique par le biais de la fluorescence qu'elles émettent. Ces NPs peuvent de plus être fonctionnalisées afin d'être couplées à une biomolécule dont on cherche à déterminer l'activité, la localisation ou même la dynamique. Elles s'inscrivent dans une longue lignée de sondes fluorescentes dont nous allons brièvement décrire les différentes évolutions.

Ce travail a profité de la collaboration avec l'équipe de Thierry Gacoin et Jean-Pierre Boilot du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (LPMC, Ecole polytechnique) pour la synthèse et la fonctionnalisation des NPs, avec l'équipe de Michel Robert Popoff de l'unité Bactéries Anaérobies et Toxines (BAT, Institut Pasteur) pour le suivi de la toxine ε et avec celle de Pierre-Louis Tharaux du Centre de Recherche Cardiovasculaire Inserm-Lariboisière pour l'étude de la signalisation vasculaire de l'endothéline-1.

1.1 Sondes fluorescentes en biologie cellulaire

Nous pouvons distinguer trois types de sondes fluorescentes utilisées en biologie cellulaire. Le premier type dont l'emploi est le plus ancien est constitué par une vaste classe de

fluorophores organiques. Le deuxième type provient d'avancées récentes en recombinaison génétique qui permettent de fusionner le gène codant pour une protéine fluorescente au gène de la protéine à étudier. Enfin, la dernière évolution se base sur les propriétés de matériaux inorganiques semiconducteurs.

1.1.1 Les fluorophores organiques

Lorsque Coons *et al*^[1] ont développé une technique permettant de marquer des anticorps avec des molécules organiques fluorescentes dans les années 1940, ils ont ouvert la voie au développement de l'immunofluorescence. Cette technique consiste à marquer des anticorps par des molécules fluorescentes, créant ainsi un marqueur ciblant l'antigène correspondant.

De même, avec le développement de la microscopie à fluorescence, les fluorophores organiques pouvant être utilisés dans ces marqueurs ont vu leur nombre grandir et leurs caractéristiques se diversifier. De deux fluorophores utilisés en 1940 (Fluoresceine et Rhodamine B), quelques centaines sont actuellement disponibles commercialement.

Ces fluorophores organiques sont essentiellement des molécules aromatiques, présentant un système d'électrons π fortement délocalisés leur conférant des propriétés de fluorescence dans la gamme visible. Les fluorophores organiques possèdent des spectres d'absorption et d'émission présentant des bandes larges, et des maxima d'absorption et d'émission peu éloignés (faible décalage de Stokes). Le faible décalage de Stokes impose souvent un compromis entre une excitation et une détection efficace. Typiquement, les fluorophores organiques présentent un coefficient d'extinction molaire de l'ordre de 5 à $200.10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, et un rendement quantique variant de 0.05 à 1. Pour donner un exemple, sur la figure suivante, est reconstituée une image tricolore permettant de localiser simultanément les noyaux (marqués par DAPI, fluorophore dans le bleu), les mitochondries (marquées par Mitotracker Red, rouge) et les filaments d'actine (marqués par Alexa Fluor Phalloidine, vert) d'une cellule de fibroblaste.

Les fluorophores permettent ainsi un marquage efficace des cellules et tissus avec une perturbation généralement limitée de l'activité des biomolécules marquées du fait de leur taille réduite (qq nm). Cependant, comme le montrent les images de b. à f. de la Fig. 1.1, nous observons une diminution rapide du signal de fluorescence avec le temps de ces fluorophores organiques (après quelques secondes et jusqu'à quelques minutes selon l'intensité d'excitation utilisée). Cette diminution rapide de la luminescence est due à une photodégradation des

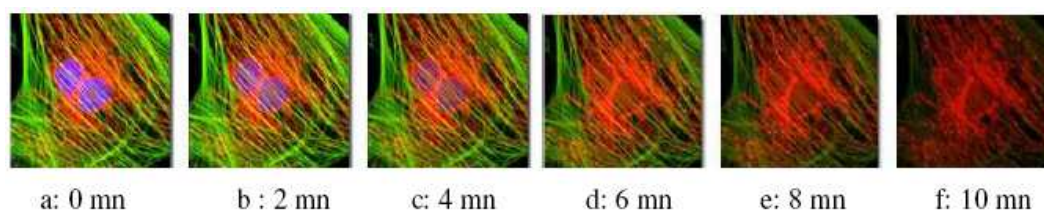


FIG. 1.1 – Cellule de fibroblaste observée par microscopie de fluorescence au cours du temps. L'ADN nucléaire est marqué en bleu par DAPI, les mitochondries en rouge par MitoTracker Red, et les filaments d'actine par Alexa Fluor Phalloidin. Les images montrées ont été prises toutes les 2 minutes.

fluorophores en présence d'oxygène. Ce phénomène irréversible empêche un suivi de biomolécules individuelles nécessitant une excitation intense pendant de longues durées, et a amené la communauté scientifique à chercher de nouveaux fluorophores plus photostables.

Une approche consiste alors à incorporer des fluorophores dans une bille polymérique. Ceci a notamment été développé pour former des billes de polystyrène contenant des fluorophores organiques, mais également des billes de silice.^[2;3;4] Outre le nombre plus important de fluorophores présents dans les billes, cette méthode permet de protéger les fluorophores de leur environnement, et ainsi d'améliorer la photostabilité globale du système.^[4] Les objets obtenus par une telle approche sont généralement d'une taille de l'ordre de quelques centaines de nanomètres, ce qui est assez important pour des sondes biologiques. L'équipe de Wiesner a récemment synthétisé des nanoparticules de silice de 30 nm, englobant des molécules de fluorophores organiques.^[3;4] Une comparaison de la luminosité de ces billes de silice fluorescentes à une molécule de fluorophore organique unique a montré que ces nanoparticules sont de l'ordre de 20 fois plus luminescentes et de 2 à 3 fois plus stables que le fluorophore unique. Leur luminosité est ainsi du même ordre de grandeur que celle des nanoparticules semi-conductrices que nous allons présenter dans la suite, mais leur photostabilité mérite d'être améliorée. Elles présentent en revanche une taille généralement très bien définie, et une surface facilement modifiable pour une biofonctionnalisation.

1.1.2 Les protéines fluorescentes

La "protéine fluorescente verte" (GFP) fût découverte par Shimomura *et al*^[5] en 1962 en tant que protéine associée à l'aéguorine, une protéine fluorescente isolée de la méduse *Aequoria*. La séquence de cette protéine a été ensuite clonée par Prasher *et al* en 1992.^[6] De nombreux mutants de cette protéine ont alors été proposés ce qui a permis notamment de

varier la longueur d'onde d'émission. Typiquement, ces protéines fluorescentes ont un coefficient d'extinction de $6 \text{ à } 90.10^3 \text{ L.m}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.^[7] La première application de cette protéine fût d'observer l'expression de certains gènes *in vivo*.^[8] Cependant, l'application la plus répandue à présent passe par la fusion génétique du gène codant la GFP et de celui de la protéine d'intérêt puis l'intromission de ce gène recombiné dans la cellule hôte afin de permettre l'expression de la protéine marquée. La GFP a ainsi ciblé des protéines de la membrane cellulaire et de pratiquement tous les compartiments cellulaires incluant le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries...^[7] Par nature, la stoechiométrie sonde fluorescente-protéine est dans ce cas de 1 pour 1 ce qui est un avantage tout à fait essentiel. Cependant, elle ne peut s'appliquer évidemment qu'au marquage de protéines dont on connaît le gène codant et peut s'avérer difficile à mettre en oeuvre du fait de l'inactivation éventuelle de l'activité de la protéine marquée.

1.1.3 Les nanocristaux semiconducteurs

Une alternative à ces sondes organiques fluorescentes pour le suivi de biomolécules individuelles a été trouvée en utilisant des sondes luminescentes inorganiques, et notamment des nanoparticules semi-conductrices.

L'avantage de ces nanocristaux est qu'il est possible, à partir d'un même matériau, de modifier ses propriétés de luminescence par effet de confinement quantique en variant sa taille entre 2 et 12 nm comme représenté sur la Fig. 1.2 extraite de la référence.^[9] Des synthèses permettant d'obtenir des objets bien dispersés, bien contrôlés en taille, forme et propriétés de luminescence ont été mises au point notamment par l'équipe de Bawendi, dans un solvant coordinant, et améliorées en ajoutant en surface une couche de ZnS.^[10] Des progrès réalisés dans la compréhension de la chimie de surface de ces nanoparticules, et la préparation de nanoparticules solubles en milieu aqueux et biocompatibles ont permis d'utiliser ces objets pour des applications biologiques.^[11;12]

Ces NPs semi-conductrices se sont avérées être une alternative intéressante aux sondes organiques fluorescentes. Leurs propriétés optiques peuvent être comparées à celles des molécules fluorescentes, et il a été montré que :

- Les nanoparticules semi-conductrices émettent de l'ordre de 20 fois plus de photons que des molécules organiques.^[13] Cependant, leurs propriétés de fluorescence sont détériorées en



FIG. 1.2 – 10 solutions de nanoparticules de CdSe/ZnS de couleur d'émission distinctes, excitées sous une lampe éclairant dans le proche U.V. De gauche à droite, les maxima d'émission sont situés à 443, 473, 481, 500, 518, 543, 565, 587, 610, et 655 nm.^[9]

milieu aqueux.

- Elles présentent un signal de fluorescence nettement plus stable que celui des fluorophores organiques. Cette stabilité est de l'ordre de 100 fois plus importante.^[13;14] Des études de suivi sur plusieurs minutes peuvent donc être réalisées avec des sondes inorganiques semiconductrices.^[15]

Du fait de ces propriétés intéressantes, ces nanoparticules semi-conductrices sont largement utilisées en tant que sondes biologiques notamment pour le marquage de biomolécules individuelles.

Elles présentent néanmoins quelques inconvénients, notamment une tendance à clignoter qui peut nuire au suivi de la biomolécule dans le temps. De plus, la nature même des nanoparticules semi-conductrices les rend cytotoxiques, par le relargage de Cadmium ou Sélénium par exemple.^[16;17]

1.2 Les nanoparticules d'oxyde dopées par des ions lanthanides

Les résultats présentés dans cette section ont été en grande partie extraits de la thèse de Domitille Giaume.^[18] Parmi les divers oxydes dopés par les ions lanthanides luminescents, nous nous sommes intéressés à un oxyde particulier, l'orthovanadate d'Yttrium dopé par de l'Europium, $Y_{1-x}Eu_xVO_4$. Sous forme de matériau massif, le vanadate d'Yttrium dopé Europium est un luminophore très efficace dans le rouge, essentiellement utilisé pour des applications d'éclairage ou de visualisation.^[19] Sous excitation UV, l'efficacité de la luminescence est principalement due à un transfert d'énergie efficace entre la matrice vanadate et les ions Europium.

Les études menées au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (LPMC) ont

permis de synthétiser des NPs d'orthovanadate d'Yttrium de quelques dizaines de nanomètres dispersées en solution. Historiquement, la voie de synthèse développée dans ce laboratoire a été la synthèse par co-précipitation de sels d'Yttrium, d'Europium et de Vanadium. Arnaud Huignard et Valérie Buissette ont contribué à l'élaboration de synthèses simples et efficaces, qui mènent à la formation de NPs de différentes tailles.^[20;21] La première synthèse correspond à une simple coprécipitation des sels d'yttrium et de Vanadium en milieu aqueux. Elle conduit à la formation d'objets de taille centrée autour de 30 nm. La dispersion en taille des objets est relativement importante, car le contrôle de la taille des objets lors de cette synthèse est assez limité. La seconde méthode met en jeu un complexant organique permettant un contrôle de la croissance des particules et conduit à des particules de 8 nm.^[21] Ces deux synthèses permettent l'obtention de NPs dont les propriétés optiques ont été bien caractérisées.^[22]

Dans cette section, nous allons décrire la synthèse de NPs de vanadate d'Yttrium dopé Europium que nous avons utilisée, à savoir la synthèse dont la taille des NPs est centrée autour de 30 nm. Notre but ici est d'obtenir des NPs dont la taille est la plus petite possible, souhaitable pour une perturbation minimale du comportement de la biomolécule à étudier, mais dont le signal de fluorescence soit détectable. La fluorescence des NPs étant liée au nombre d'ions Europium présents, il est donc nécessaire de faire un compromis entre une petite taille et une fluorescence détectable, ce que permettent des NPs d'une taille de l'ordre de 20-30 nm. Nous décrirons dans un second temps les propriétés optiques de ce type de NPs.

1.2.1 Synthèse des nanoparticules

Lors de la synthèse par précipitation de sels métalliques mise au point par Huignard, des nitrates d'Yttrium et d'Europium ont été utilisés comme sources d'ions Y^{3+} et Eu^{3+} , et de l'orthovanadate de sodium comme source d'ions VO_4^{3-} .

Une solution aqueuse de Na_3VO_4 à 0.1 M est fraîchement préparée. Son pH est mesuré, et ajusté si nécessaire à une valeur comprise entre 12.6 et 13. Un volume de solution de $Y_{1-x}Eu_x(NO_3)_3$ à 0.1 M au total en ions Y^{3+} et Eu^{3+} est ajouté goutte à goutte à la pompe péristaltique dans la solution de Na_3VO_4 sous agitation. Un précipité blanc laiteux apparaît dès l'ajout de la solution de $Y_{1-x}Eu_x(NO_3)_3$. L'ajout se poursuit jusqu'à ce que le pH atteigne une valeur de 8-9. La solution contient de nombreux contre-ions dont la présence est néfaste à la stabilisation des particules en solution. Elle est ensuite purifiée par trois centrifugations à

11000 g pendant 20 minutes suivies chacune d'une redispersion par sonification. Cette solution est dialysée pendant 16 heures afin d'obtenir une solution de conductivité inférieure à $100 \mu\text{S.cm}^{-2}$. La solution finale est très diffusante et flocule après quelques jours. Nous verrons dans le chapitre 5 consacré à la fonctionnalisation des NPs la seconde étape essentielle avant l'utilisation de ces NPs dans un contexte biologique qui consiste en l'enrobage des NPs par une couche d'alkoxysilane.

1.2.2 Propriétés structurales

Nous allons nous intéresser aux propriétés structurales des NPs ainsi qu'à leur cristallinité et à leur taille.

Structure Zircon

L'orthovanadate d'Yttrium massif cristallise selon le groupe d'espace $I4_1/\text{amd}$ (D_{4h}^{19}), dans la structure quadratique de type zircon (ou xenotime), dont les paramètres de mailles sont les suivants : $a_0 = b_0 = 7,123 \text{ \AA}$ et $c_0 = 6,291 \text{ \AA}$.^[21] La figure suivante extraite de la référence^[23] est une représentation schématique d'une telle structure :

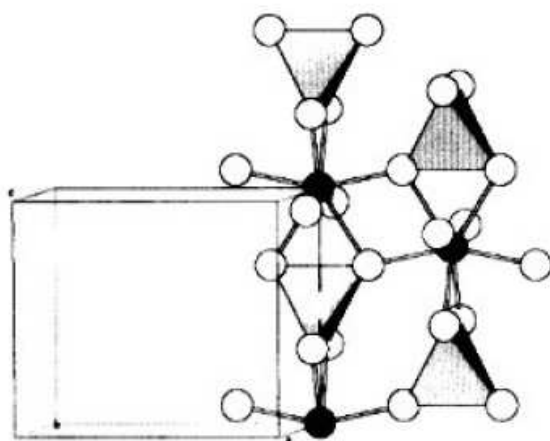


FIG. 1.3 – Maille unitaire de YVO_4 de structure zircon. Les groupements VO_4 sont représentés schématiquement par des tétraèdres, les polyèdres YO_8 sont indiqués par les ions Y^{3+} représentés en noir, entourés de 8 ions O^{2-} représentés en blanc. Figure extraite de la référence^[23].

La structure des objets obtenus lors de la synthèse colloïdale a été caractérisée par diffraction des rayons X (DRX) au LPMC. Les pics observés sur le diagramme de diffraction d'une poudre des nanocristaux peuvent tous être attribués à la structure zircon.

Taille et cristallinité des particules

Deux méthodes ont été utilisées par l'équipe du LPMC pour évaluer la taille de nos NPs :

- la DRX permet d'obtenir la longueur de cohérence monocristalline. Cette longueur de cohérence ne correspond à la taille de l'objet que lorsque celui-ci est monocristallin et ne présente pas de défauts.
- la microscopie électronique permet de visualiser les objets par leur contraste électronique.

Nous proposerons dans le chapitre 2 une méthode optique pour déterminer la taille des NPs à partir du nombre de photons émis par NP.

Le diagramme des Rayons X montre des pics élargis par rapport aux pics obtenus pour une poudre de matériau massif. Cet élargissement des raies de diffraction est dû principalement à la taille finie des domaines cristallins, mais des déformations de la maille ainsi que des défauts cristallins étendus peuvent également y participer. En négligeant la contribution des défauts cristallins dans les NPs de $Y_{1-x}Eu_xVO_4$, nous pouvons calculer à partir de l'élargissement des raies de diffraction la longueur de cohérence monocristalline par la formule de Debye-Scherrer. La longueur de cohérence moyenne mesurée est de 13 nm, mais une grande dispersion des valeurs est observée.^[18]

Des clichés de microscopie électronique en transmission (MET) ont été réalisés au Laboratoire des Solides Irradiés à l'Ecole Polytechnique, sur un microscope électronique à transmission Phillips CM 30, muni d'une cathode de LaB6, fonctionnant à 300 KeV, et présentant une résolution de 0.235 nm. Nous déduisons des images de MET une distribution en taille caractérisée par une largeur moyenne des NPs de 19 nm (± 7 nm), tandis que leur longueur moyenne est de 33 nm (± 12 nm).

Une comparaison de ces valeurs avec les longueurs de cohérence déterminées par diffraction des rayons X montre que les NPs sont polycristallines ou que leur structure cristalline présente de nombreux défauts.

La cristallinité des objets peut être visualisée sur un cliché de MET en haute résolution. La haute résolution permet d'obtenir un niveau de résolution de l'image de l'ordre de quelques Angströms. La nanoparticule montrée dans la figure suivante à droite est monocristalline mais présente aussi de nombreux défauts cristallins en son sein ce qui est révélée par la présence d'une inhomogénéité du contraste. Ceci explique la différence mesurée entre la longueur de cohérence et la taille des objets. La présence de ces défauts cristallins sera largement commentée

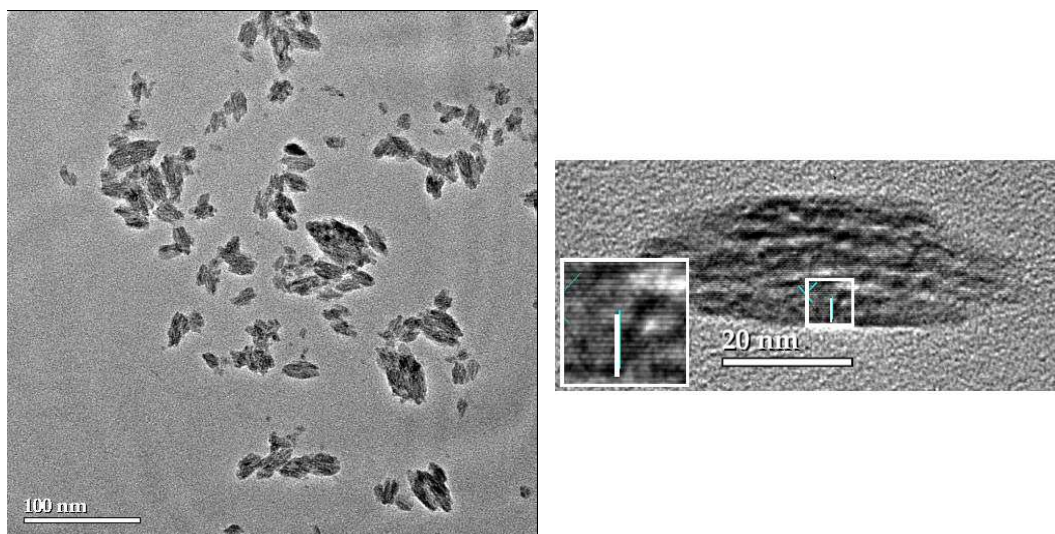


FIG. 1.4 – Cliché de microscopie électronique en transmission réalisé sur une solution de NPs $\text{Y}_{0.6}\text{Eu}_{0.4}\text{VO}_4$ dans l'éthylèneglycol (gauche). Cliché de microscopie électronique à transmission à haute résolution d'une nanoparticule $\text{Y}_{0.95}\text{Eu}_{0.05}\text{VO}_4$ (droite). La structure cristalline apparaît par franges.

dans le chapitre 3 portant sur la photophysique des NPs.

1.2.3 Propriétés optiques

Nous allons décrire dans cette partie les principales propriétés optiques des NPs $\text{Y}_{1-x}\text{Eu}_x\text{VO}_4$, à savoir leurs absorbances et leurs propriétés de luminescence.

Mesures d'absorbance

Les NPs de YVO_4 absorbent dans l'U.V., cette absorption étant due à un transfert de charge entre le Vanadium et les atomes d'oxygènes de l'ion vanadate VO_4^{3-} . Lorsque les NPs de YVO_4 sont dopées avec un ion lanthanide, l'absorption de cet ion lanthanide apparaît également. Dans le cas de l'Europium, les raies d'absorption dues à Eu^{3+} sont situées à 396 nm, 466 nm et 545 nm. Comme ceci est montré sur la figure suivante, l'absorption des vanadates est nettement plus importante que celle des ions Europiums.

Nous indiquons dans le tableau suivant les valeurs des coefficients molaires d'extinction, des coefficients d'absorption (α) et des sections efficaces d'absorption (σ) pour les différentes transitions mentionnées précédemment et mesurées par l'équipe du LPMC.

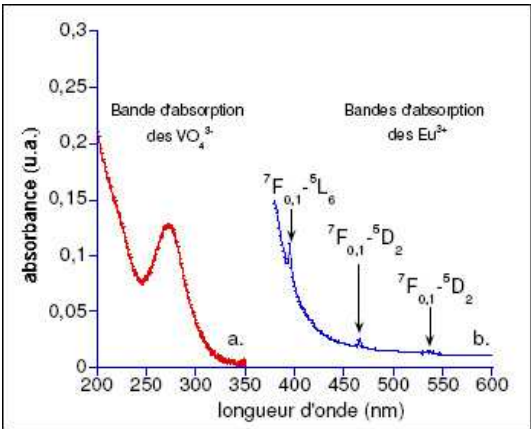


FIG. 1.5 – Spectre d’absorbance typique des NPs de $Y_{1-x}Eu_xVO_4$. Les raies d’absorption des ions Europium ont été enregistrées pour une plus forte concentration en NPs. [18].

| ion absorbeur | VO_4^{3-} 280 nm | Eu^{3+} 396 nm | Eu^{3+} 466 nm |
|---|--------------------|------------------|------------------|
| ϵ (l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) | 2730 | 1,3 | 0,4 |
| σ (cm ²) | $1,04.10^{-17}$ | $5,05.10^{-21}$ | $1,41.10^{-21}$ |
| α (cm ⁻¹) | 131000 | 13 | 3 |

FIG. 1.6 – Valeurs des coefficients molaires d’extinction , des sections efficaces et des coefficients d’absorption à différentes longueurs d’onde pour des NPs de $Y_{0,8}Eu_{0,2}VO_4$.

Spectre d’excitation et d’émission

Afin de caractériser la luminescence des NPs, des spectres d’excitation et d’émission sont réalisés sur un spectrofluorimètre Hitashi F-4500. Le spectre d’excitation est réalisé pour une émission à 617 nm (longueur d’onde correspondant à la bande d’émission la plus intense), tandis que le spectre d’émission est réalisé pour une excitation dans la bande de transfert de charge des vanadates à 280 nm.

Le spectre d’excitation pour une émission à 617 nm présente deux contributions. La bande large et intense, présentant un maximum d’intensité à 280 nm, correspond à l’absorption des groupements vanadates VO_4^{3-} dans une bande de transfert de charge. Cette bande est saturée sur le spectre d’excitation montré. Les raies fines et peu intenses observées à 396 nm, 466 nm et 545 nm correspondent à des transitions $4f^n-4f^n$ de l’Europium. Ainsi, il existe deux mécanismes permettant d’exciter l’ion Europium dans la matrice YVO_4 :

- une excitation directe des ions Eu^{3+} dans le visible ou le proche U.V. avec un faible coefficient d’absorption.
- une excitation à plus haute énergie (280 nm) via la matrice vanadate suivie d’un transfert d’énergie entre les groupements VO_4^{3-} et les ions Eu^{3+} .

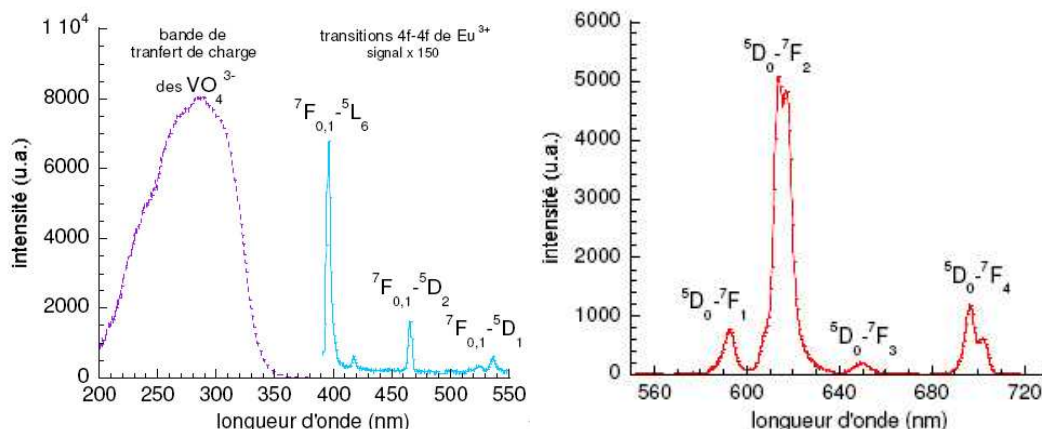


FIG. 1.7 – Spectre d'excitation ($\lambda_{em}=617$ nm) et spectre d'émission ($\lambda_{abs}=280$ nm) des NPs de $Y_xEu_{1-x}VO_4$.

Le rendement quantique des NPs, *i. e.* le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés, sera présenté plus en détail dans le chapitre 2 et est compris entre 7 et 20%.

Dans la mesure où une excitation UV peut être néfaste pour les cellules, nous nous sommes surtout intéressés dans cette thèse à une excitation directe des NPs via les ions Europium. Plus précisément, les NPs seront excités via la transition ${}^7F_{0,1}-{}^5D_2$ à 466 nm. Cette transition a une section efficace faible qui se situe à plusieurs ordres de grandeur en dessous de celle des autres sondes fluorescentes. Cependant, chaque NP est constituée de plusieurs dizaines de milliers d'ions Europium. Nous verrons dans le chapitre 2 que l'absorption des NPs est suffisante pour pouvoir les détecter individuellement. Enfin, nous détecterons la luminescence émise liée à la transition ${}^5D_0-{}^7F_2$ (615 nm et 619 nm).

Nous présentons dans la section suivante le dispositif expérimental utilisé dans cette thèse qui a permis de réaliser des études en NPs uniques.

1.3 L'approche molécules individuelles

1.3.1 Ensemble de molécules versus molécules individuelles

Cette thèse est placée dans le cadre général de l'étude de phénomènes physiques ou biologiques à l'échelle de la molécule individuelle. Ce cadre permet notamment d'obtenir des informations inaccessibles aux expériences réalisées sur un ensemble de molécules.^[24]

- Si nous supposons qu’une molécule peut exister par exemple dans deux états distincts, l’étude sur un ensemble de ces molécules ne pourra révéler que l’"état moyen" dans laquelle se trouvent ces molécules alors que chaque molécule ne peut pas exister dans cet état moyen. En d’autres termes, les mesures d’ensemble permettent la détermination d’une valeur moyenne sans accès à la distribution des états.
- De nombreux phénomènes physiques ou biologiques sont par nature transitoires ce qui peut être complètement transparent pour des mesures d’ensemble dans le cas notamment où une population biologiquement inactive domine l’échantillon d’étude. De plus, si ces phénomènes ne sont pas synchronisés, les mesures d’ensemble ne restitueront pas leur dynamique réelle.
- Enfin, et cela procède d’une évidence, les interprétations des mesures d’ensemble cherchent toutes à inférer le véritable processus ayant lieu à l’échelle de la molécule unique sans toutefois posséder toutes les informations nécessaires à son élucidation ce qui entraîne qu’elles sont rarement univoques. La détection de molécules uniques permet de s’affranchir de ces incertitudes.

L’étude de molécules uniques est donc particulièrement adaptée pour des phénomènes biologiques pour lesquels il existe généralement des sous populations ayant des activités, des constantes de réaction ou encore des dynamiques distinctes. Dans le cadre du suivi de biomolécules individuelles marquées par des sondes fluorescentes, la microscopie de fluorescence en plein champ s’est imposée. Nous décrivons dans la section suivante ce dispositif expérimental qui a été utilisé tout au long de cette thèse.

1.3.2 Montage expérimental

La microscopie en plein champ est la technique la plus répandue pour des expériences optiques sur des molécules individuelles. Contrairement à la microscopie confocale ou non-linéaire qui utilise un balayage du faisceau exciteur sur la zone à observer, la microscopie en plein champ permet de réaliser en une seule acquisition une image d’une région dont la taille peut être relativement importante. Typiquement, des zones de 20 à 40 μm sont observées par cette technique ce qui est tout à fait adaptée à la taille de la plupart des cellules.

L’excitation des NPs par la transition ${}^7\text{F}_{0,1}-{}^5\text{D}_2$ emploie une des raies du laser Argon (465,8 nm). Un faisceau convergent arrive sur la face d’entrée de l’objectif du microscope (Axiovert

100, Zeiss) afin d'élargir le faisceau excitateur au niveau de l'échantillon. Une lame dichroïque est placée sur le parcours du faisceau afin de réfléchir cette longueur d'onde d'excitation et de transmettre l'émission des NPs après leur excitation. L'objectif, de grossissement 100x ou 63x, focalise le faisceau sur l'échantillon. Typiquement, la zone éclairée est de $30\text{ }\mu\text{m}$ par $30\text{ }\mu\text{m}$ et les intensités incidentes utilisées proches de quelques $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Cet échantillon (cellules, NPs...) est placé sur une lamelle de microscopie (épaisseur $170\text{ }\mu\text{m}$) en verre ou en silice. Les NPs excitées émettent alors de façon isotrope; une partie de cette émission est collectée par l'objectif. Typiquement pour un objectif d'ouverture numérique 1.4 et un coefficient de transmission à 617 nm de 0.88, 30 % des photons associés à cette émission sont recoltés. Cette émission est ensuite transmise par la dichroïque vers la caméra CCD ("charge coupled device"). Un système afocal de lentilles permet d'assurer un grandissement de 8/5 de l'image formée sur la CCD. De plus, un filtre interférentiel étroit ($617, \Delta\lambda = 8\text{ nm}$) et adapté à la transition radiative $^5\text{D}_2\text{-}^7\text{F}_2$ (615 et 619 nm) est utilisé pour rejeter au maximum les différents signaux parasites (signal résiduel dû au laser, fluorescence de la lamelle, des cellules...). La caméra CCD est refroidie à l'azote liquide afin de limiter le bruit thermique et est illuminée par l'arrière afin d'avoir un rendement quantique de détection important (de l'ordre de 85 %). En tenant compte de l'ensemble des pertes, nous recoltons grâce à ce montage 9.6 % des photons émis par les NPs. Dans l'approche molécules uniques, ce nombre de photons détectés est un des paramètres essentiels qui détermine notamment la précision de localisation de chaque NP et la résolution temporelle avec laquelle on peut continuer à détecter les NPs (cf. chap. 7).

1.4 Problématiques étudiées

Ce manuscrit est constitué de 6 chapitres (7 en comptant ce chapitre d'introduction) relativement indépendants qui répondent à des problématiques différentes concernant ces NPs. Ainsi, chaque chapitre comportera une introduction relative à ces problématiques. De manière transversale, nous pouvons dire que toutes ces études se situent dans le cadre d'une approche des phénomènes physiques ou biologiques à l'échelle des molécules individuelles. Les quatre premiers chapitres traitent d'aspects fondamentaux concernant ce type de NPs. Les deux derniers chapitres portent sur des applications en biologie cellulaire.

Le premier chapitre s'intéresse à une méthode de détermination de la taille de ces NPs

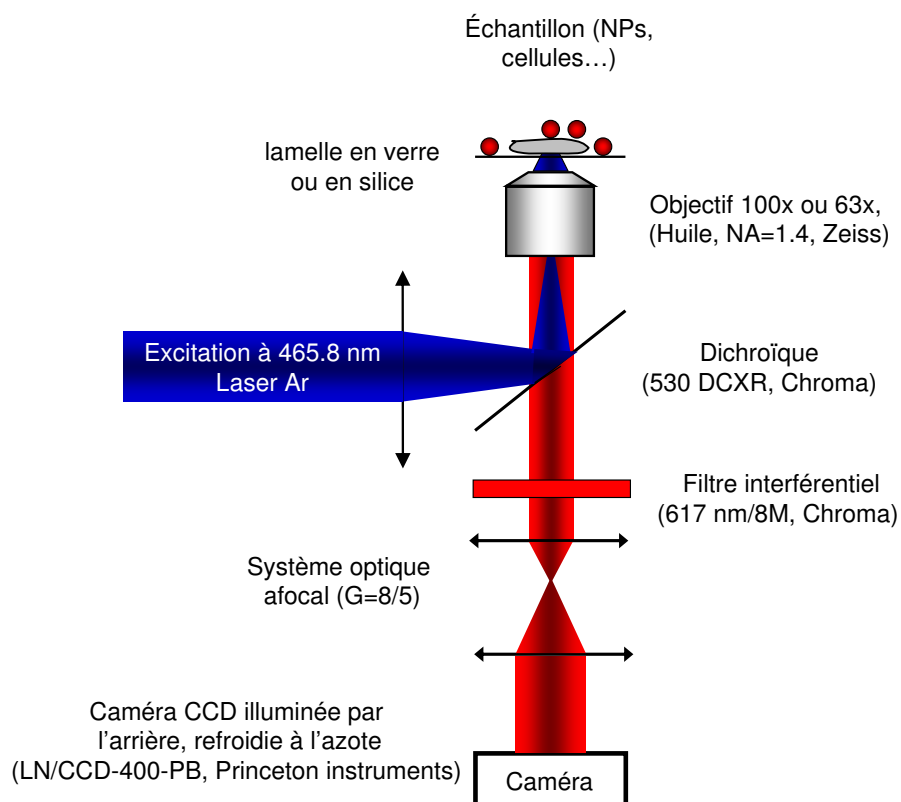


FIG. 1.8 – Dispositif expérimental de microscopie d'épifluorescence en champ large. La lentille de tube a été omise dans le schéma.

par voie optique. Cette méthode est basée sur la correspondance entre le nombre de photons émis par chaque NP et sa taille. Les différents paramètres dont dépendent cette détermination ainsi que le traitement d'images permettant d'accéder à une estimation précise du nombre de photons émis seront discutés.^[25]

Le second chapitre traite de la photophysique des NPs. Seront détaillés les différentes caractéristiques du photoblanchiment des NPs, son origine et un modèle analytique permettant d'en rendre compte. Cette étude conduira à un lien direct entre la baisse du nombre de photons émis au cours du temps par NP et une photo-réduction des ions Europium. Ceci sera à la base de l'application de ces NPs en tant que senseurs à peroxyde d'hydrogène.

Le troisième chapitre porte sur des expériences de transfert d'énergie résonant (FRET) entre NPs et fluorophores organiques de type cyanine.^[26]

Le quatrième chapitre est dévolu à la fonctionnalisation des NPs et à leur couplage avec des biomolécules d'intérêt. Nous présenterons tout d'abord le processus d'enrobage des NPs par une couche d'alcoxysilane réalisé au LPMC. Ceci sera le point de départ du travail effectué

au LOB aboutissant au couplage des NPs avec notamment des toxines et à une méthode de détermination du nombre de protéines par NP individuelle.^[27]

Les cinquième et sixième chapitres seront consacrés aux applications de ces NPs dans les domaines, respectivement, de la détection de la production de H_2O_2 intracellulaire et au suivi de toxines ε individuelles fixées à leur récepteur membranaire. Notons enfin que nous ne discuterons pas dans ce manuscrit le marquage des canaux sodiques par ces NPs.^[28]

Chapitre 2

Détermination optique de la taille des nanoparticules

2.1 Enjeux et objectifs

Pour connaître la taille d'objets nanométriques, l'outil le plus couramment utilisé est le microscope électronique. Suivant les travaux de de Broglie donnant la correspondance approchée entre la longueur d'onde, la masse et la vitesse associées à une particule, il est possible, à l'aide d'un faisceau d'électrons suffisamment accélérés, d'obtenir une image de ces objets avec une résolution inférieure au nanomètre. La microscopie électronique, notamment celle en transmission, s'est imposée comme l'outil de référence pour mesurer la taille et la dispersion en taille des nanoparticules, leur morphologie et leur cristallinité. Les études en diffraction des rayons X donnent toutefois pour la cristallinité des informations plus précises telles que le type de phase cristalline et la longueur de cohérence des domaines monocristallins. Cependant cette technique nécessite pour son utilisation la présence d'une personne spécialiste à même d'effectuer les réglages et alignements parfois fort fastidieux et suffisamment de temps d'expérimentations.

Une autre technique est couramment utilisée : la diffusion dynamique de la lumière (DDL). Brièvement, elle consiste à mesurer et à analyser les fluctuations de l'intensité laser diffusée I au cours du temps par une solution colloïdale. Pour ce faire, on définit une fonction d'auto-corrélation $C(\vec{s}, t_d)$ où \vec{s} et t_d représentent respectivement le vecteur de diffusion et le retard

temporel :

$$C(\vec{s}, t_d) = \langle I(\vec{s}, 0), I(\vec{s}, t_d) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(\vec{s}, t) I(\vec{s}, t + t_d) dt. \quad (2.1)$$

Cette fonction d'autocorrélation est calculée pendant la mesure de diffusion pour des valeurs discrètes de t_d . On comprend alors aisément que pour des valeurs grandes de t_d , les valeurs I sont indépendantes et la fonction d'autocorrélation tend vers zéro. Il a été montré que la fonction d'autocorrélation décroît de façon monotone en fonction de t_d et peut s'écrire :

$$C(\vec{s}, t_d) \propto 1 + \xi |g_1(\vec{s}, t_d)|^2. \quad (2.2)$$

où ξ est une constante expérimentale et g_1 une fonction décroissante. Pour une solution colloïdale, monodisperse, diluée et constituée de particules sphériques, il peut être montré que :

$$g_1(\vec{s}, t_d) = e^{-Ds^2 t_d}. \quad (2.3)$$

Or, le coefficient de diffusion D est relié au rayon hydrodynamique R_h des particules par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_h}. \quad (2.4)$$

où k_b désigne la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité du milieu. Ainsi, dans ce cas idéal, on peut déduire le rayon hydrodynamique des NPs à partir de la mesure de la fonction d'autocorrélation. De plus dans le cas de particules polydisperses, la fonction g_1 peut être écrite sous la forme de fonctions monoexponentielles pondérées. Pour extraire la distribution en taille, on peut par exemple utiliser la méthode des cumulants où la fonction g_1 est développée en termes successifs :

$$\ln g_1(\vec{s}, t_d) = -Ds^2 t_d + \sigma^2 s^4 \frac{t_d^2}{2} + \dots \quad (2.5)$$

De cette présentation succincte, on comprend à présent que, si la solution colloïdale est trop polydisperse, les termes correctifs deviennent prédominants, rendant cette technique inopérante et ce même en utilisant des algorithmes itératifs plus développés. De plus, la diffusion dynamique de la lumière, mesurant le rayon hydrodynamique des particules, est très sensible à l'état de surface des particules. Comme nous le verrons par la suite, la distribution en tailles des NPs étant large et l'état de surface devant souvent être modifié au cours du processus de

fonctionnalisation, il nous fallait trouver une méthode de détermination de la taille des NPs qui pouvait être effectuée plus précisément que la diffusion dynamique de la lumière et plus rapidement que la microscopie électronique en transmission.

Une autre possibilité aurait été d'utiliser des gels d'électrophorèse. En effet, une des méthodes classiques pour déterminer la masse de protéines ou bien de virus consiste à faire migrer ces molécules chargées dans un gel par application d'un champ électrique. La distance de migration permet alors d'estimer leur masse par comparaison à une calibration effectuée sur des molécules de masse connue. Dans notre cas, il aurait fallu utiliser, comme référence, des NPs d'or ou semiconductrices ayant une charge de surface proche de celle des NPs d'oxyde. Il aurait donc fallu pouvoir non seulement quantifier précisément l'état de surface des NPs d'oxyde mais aussi reproduire à l'identique cet état sur des NPs de référence et ce pour chaque étape de fonctionnalisation. On comprend alors que nous nous serions retrouvés avec une méthode de caractérisation encore plus complexe que la microscopie électronique.

De ce qui précède découlent les premières justifications pour la mise au point d'une méthode différente de mesure de taille des NPs.

Dans une problématique de détection de molécules uniques, il nous faut par essence nous assurer que les objets que nous observons sont bien des objets uniques. Un des avantages des quantum dots (QDs) pour déterminer en microscopie leur présence individuelle est leur clignotement. La première observation de ce phénomène sur des nanocristaux uniques de CdS^[29] montra que l'émission d'un nanocrystal unique apparaît puis disparaît de façon intermittente. Un grand nombre de recherches s'est attaché à comprendre l'origine du phénomène, essentiellement la présence de pièges à porteurs de charge, et à le modéliser avec la distribution en loi de puissances du temps pendant lequel le nanocrystal n'émet pas^[30;31] ou bien avec les vols de Lévy^[32;33] décrivant plus globalement le phénomène d'intermittence. Le point intéressant est que l'observation de l'intermittence de l'émission d'un spot en microscopie de fluorescence, *i.e.* l'image d'un objet lumineux dont les dimensions sont inférieures à la résolution du microscope limitée par diffraction (typiquement la moitié de la longueur d'onde d'émission), est rendue impossible si plusieurs nanocristaux semiconducteurs se trouvent à une distance inférieure à ce que peut résoudre spatialement le microscope. Ainsi, l'intermittence de l'émission et les distributions de temps associées permettent de s'assurer que la tache de diffraction putativement liée à un nanocrystal correspond bien à un nanocrystal unique. Insistons toutefois sur le fait que l'observation d'une intermittence ne constitue pas une preuve suffisante dans

la mesure où l'on peut toujours l'observer avec deux nanocristaux semiconducteurs proches mais avec précisément une modification significative des distributions des temps dans l'état "noir".^[34]

Pour les fluorophores organiques, une méthode simple là aussi permet de déterminer si l'objet observé est unique. Il s'agit d'enregistrer le signal de luminescence au cours du temps et d'observer le phénomène irréversible de photoblanchiment qui se manifeste par une décroissance abrupte du signal. A partir du nombre de marches observées dans un spot donné, on déduit le nombre de fluorophores. Ainsi la présence d'un marche unique assure que le spot correspond bien à un fluorophore unique.

Un autre phénomène, l'*anti-bunching*, permet aussi de s'assurer de la présence d'un centre émetteur unique^[35;36]. Même si ce phénomène a une origine purement quantique, nous pouvons nous en faire une image classique satisfaisante. Dans une expérience de corrélation temporelle de l'émission, on enregistre la probabilité qu'un photon arrive sur le détecteur à $t > 0$ sachant qu'un photon est arrivé à $t = 0$. Après l'émission du photon à $t = 0$, le système quantique représentant l'émetteur unique se trouve dans son état fondamental. La probabilité d'émettre un second photon est donc nulle. En moyenne, il faut attendre suffisamment de temps, de l'ordre de la moitié de la période dite de Rabi, pour qu'un second photon puisse être émis après excitation vers un des niveaux excités de l'émetteur unique. Ainsi, dans les cas des fluorophores organiques et des nanoparticules semiconductrices qui peuvent être décrites comme des atomes artificielles, la mesure de la corrélation temporelle de l'émission permet de déterminer si un centre émetteur est unique.

Dans la mesure où les nanoparticules d'oxyde dopées par des ions terres rares sont constituées d'un grand nombre de centres émetteurs, nous ne pouvons en aucune manière observer ni l'intermittence éventuelle de leur émission ni un photoblanchiment par marches ni l'*anti-bunching*.

C'est précisément dans ce contexte qu'est né le désir de mesurer la taille des NPs par des mesures optiques en microscopie. En effet, si nous pouvions être capable de déduire la taille à partir d'une mesure optique alors nous pourrions être capable de savoir si le spot de diffraction correspond à une NP plutôt qu'à deux en admettant simplement que le signal de deux NPs est égal au double de celui correspondant à une. La condition nécessaire est que la distribution en taille soit suffisamment étroite.

Nous nous proposons dans la suite de présenter une méthode originale et applicable à

toutes les NPs fluorescentes constituées d'un grand nombre de centres émetteurs.

2.2 NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$: un ensemble de systèmes à trois niveaux équivalents

De manière générale, chaque centre émetteur fluorescent, de part ces caractéristiques photophysiques, émet un nombre déterminé et déterminable de photons pendant un intervalle de temps donné. En microscopie optique de NPs uniques, nous pouvons assigner à chaque NP individuelle un nombre de photons émis. De plus, le nombre de photons émis par une NP correspond, sous certaines conditions, au nombre de photons émis par un centre émetteur multiplié par le nombre de centres émetteurs par NP. Dans le cas d'un dopage homogène d'une matrice cristalline, le nombre de dopants présents dans chaque unité cristalline est constant. Connaissant les paramètres de maille, *i.e.* les distances caractéristiques entre chaque unité, on peut calculer le nombre d'unités cristallines et donc le nombre de centres émetteurs pour une taille donnée de NPs. Ainsi, nous pouvons déduire du nombre de photons émis par une NP la taille de cette NP.

Dans ce qui suit, nous allons nous attacher tout d'abord à présenter dans quelle mesure un centre émetteur unique peut émettre un nombre de photons déterminé en ayant recours à la modélisation simple d'un système à trois niveaux. Ensuite, nous verrons comment effectuer la généralisation à un ensemble de systèmes à trois niveaux équivalents.

2.2.1 Le système à trois niveaux

De manière générale, le modèle le plus simple pour décrire la fluorescence d'un émetteur est celui à deux niveaux : un photon exciteur provoque avec un certain taux par unité de temps, ω , la transition de l'état fondamental (0) à l'état excité (1), ceci idéalisant les différents niveaux d'énergie du centre émetteur. Une fois ce centre promu dans son état excité il peut soit émettre un photon avec un taux par unité de temps k_r , soit se désexciter de façon non-radiative avec un taux par unité de temps k_{nr} . Comme nous le verrons en détail dans le chapitre 2, les ions Europium pouvant être photo-réduits, il faut alors tenir compte dans le modèle de la possibilité que ces centres deviennent non-fluorescents. On introduit de manière classique un troisième niveau (2) dans cette description et un taux k_{pr} .

Enfin, dans la mesure où cet état réduit ne peut pas rapidement s'oxyder, il n'est pas utile de considérer un taux de passage entre l'état (2) et (0).

Ce modèle décrivant complètement le système, on assigne une certaine probabilité de présence de l'émetteur dans chacun de ces niveaux représentée par N_0 , N_1 et N_2 .

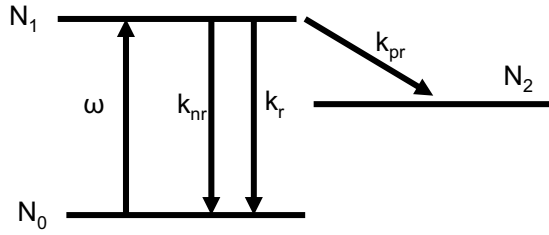


FIG. 2.1 – Système à trois niveaux représentant l'état des ions Europium (état fondamental de l'ion Europium 3+ : 1, état excité de l'ion Europium 3+ : 2, état représentant l'ion Europium 2+.)

Ce modèle classique va nous permettre d'exprimer simplement le nombre de photons émis par un ion Europium pour un intervalle de temps donné. Nous proposons par la suite une rapide dérivation de ce nombre ce qui donnera également lieu à la présentation des différentes caractéristiques photophysiques des ions Europiums.

On écrit, tout d'abord, le système d'équations différentielles régissant le système :

$$\frac{dN_0}{dt} = -\omega N_0 + k N_1 \quad (2.6)$$

$$\frac{dN_1}{dt} = \omega N_0 - (k + k_{pr}) N_1 \quad (2.7)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = k_{pr} N_1 \quad (2.8)$$

en notant k , la somme des deux taux k_r et k_{nr} .

Le paramètre ω est directement relié à σ , la section efficace d'absorption des ions Europium trivalents ($1.41 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^2$), à I , l'intensité incidente, et à $h\nu$, l'énergie des photons incidents, h étant la constante de Planck et ν la fréquence des photons incidents, par l'équation :

$$\omega = \frac{\sigma I}{h\nu}. \quad (2.9)$$

D'une part, comme l'intensité incidente couramment utilisée dans nos expériences est de l'ordre de 5 kW.cm^{-2} , ω est proche de 20 s^{-1} . D'autre part, le temps de vie du niveau excité est proche de $500 \mu\text{s}$ ce qui correspond à un k de l'ordre de 2000 s^{-1} . Ainsi, il y a approximativement deux ordres de grandeur entre ces deux taux de passage. Nous reviendrons sur ce point plus loin mais dès à présent nous pouvons considérer que le processus d'émission

de photons est très éloigné d'une quelconque saturation du niveau excité.

Le nombre de photons émis est directement relié à l'évolution de N_1 . Nous allons tout d'abord déduire cette évolution dans le cas où il n'existe pas de réduction, *i.e.* $k_{pr}=0$. L'évolution de N_1 s'écrit, en supposant que $N_1(t=0)=0$, simplement comme :

$$N_1(t) = \frac{\omega}{\omega + k}(1 - e^{-(\omega + k)t}), \quad (2.10)$$

ce qui compte tenu des ordres de grandeur donnés plus haut se simplifie en :

$$N_1(t) = \frac{\omega}{k}(1 - e^{-kt}). \quad (2.11)$$

Il est alors important de noter qu'au bout de quelques millisecondes, le système atteint un état quasi-stationnaire. De plus, l'intervalle de temps dans lequel nous récoltons les photons étant de l'ordre de quelques centaines de millisecondes pour ce type de NPs, nous pourrions par la suite négliger le temps nécessaire pour arriver à l'état quasi-stationnaire.

Intéressons nous maintenant au cas plus réel décrivant aussi le processus de réduction. Dans la mesure où les temps de photo-réduction sont supérieurs à la seconde ($k_{pr} < 1$ s), nous voyons apparaître dans le système d'équations différentielles précédent deux échelles de temps : l'une pour les processus d'absorption et d'émission et l'autre pour celui de photo-réduction. On peut alors considérer que N_1 atteint sa valeur stationnaire avant que ne débute le processus de photo-réduction. Cette fois, l'évolution de N_1 s'écrit donc :

$$N_1(t) = \frac{\omega}{\omega + k} e^{-\frac{k_{pr}\omega}{\omega + k}t}. \quad (2.12)$$

Ainsi, si nous définissons le temps caractéristique de photo-réduction τ_{pr} comme :

$$\tau_{pr} = \frac{1}{k_{pr}} \frac{\omega + k}{\omega} \quad (2.13)$$

$$\approx \frac{1}{k_{pr}} \frac{k}{\omega}, \quad (2.14)$$

l'évolution de N_1 peut s'écrire sous la forme :

$$N_1(t) = \frac{\omega}{k} e^{-\frac{t}{\tau_{pr}}}. \quad (2.15)$$

Le nombre de photons émis N_{ph} pendant l'intervalle de temps $[0, T]$ se déduit simplement de l'évolution de N_1 en notant qu'un photon est émis avec une probabilité k_r à chaque fois que l'ion Europium se trouve dans son état excité. Ainsi, on obtient :

$$N_{ph} = \frac{wk_r}{k} \int_0^T e^{-\frac{t'}{\tau_{pr}}} dt' \quad (2.16)$$

$$= \frac{wk_r}{k} (1 - e^{-\frac{T}{\tau_{pr}}}) \tau_{pr}. \quad (2.17)$$

Enfin, en définissant le rendement quantique Q comme le rapport $\frac{k_r}{k}$ ce qui correspond concrètement au rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés, on aboutit à :

$$N_{ph} = wQ(1 - e^{-\frac{T}{\tau_{pr}}}) \tau_{pr}. \quad (2.18)$$

Ainsi, de manière théorique si l'on connaît le taux ω , le rendement quantique et le temps caractéristique de photo-réduction, on peut remonter au nombre de photons émis par un centre émetteur. Il est bien sûr impossible de mesurer ces différents paramètres pour un centre émetteur unique, les mesures se faisant en général soit sur une NP individuelle soit en solution sur un ensemble de NPs. A ce point de raisonnement, il est intéressant de décrire de manière qualitative comment sont réalisés les mesures de ces différents paramètres et quelles peuvent-être leurs distributions associées. L'intensité incidente et les temps caractéristiques de photo-réduction pouvant être mesurés précisément à l'échelle de la NP unique ne posent pas de problèmes de détermination et seront détaillés plus loin. Le but de ce qui suit est de s'assurer que la variabilité inhérente à ces différents paramètres n'est pas trop importante ce qui rendrait impossible toute mesure absolue de la taille. Autrement dit, nous voulons savoir si nous pouvons généraliser ce dernier résultat à une NP en supposant que tous les centres émetteurs sont équivalents.

Dans ce qui suit, nous allons examiner la variabilité des deux paramètres intervenant dans le calcul de la taille : le taux d'excitation ω et le rendement quantique Q .

2.2.2 Variabilité du taux d'excitation ω

Le paramètre ω contient essentiellement la section efficace d'absorption, σ , qui peut être variable. La structure électronique des ions lanthanides, dont l'Europium fait partie, est ca-

ractérisée par une couche électronique $[\text{Xe}]4f^n$ incomplète et protégée de l'environnement extérieur par les couches externes remplies 5s et 5p. Les orbitales électroniques $[\text{Xe}]4f^n$, moins étendues spatialement que les orbitales externes 5s et 5p du Xenon, sont des orbitales électroniques internes, non liantes. Ces ions sont ainsi peu sensibles au champ cristallin dans lequel ils sont insérés, ce qui se traduit sur un diagramme en coordonnées de configuration par la superposition des niveaux d'énergie des différents états $^{2S+1}L_J$ issus de la configuration $4f^n$. En conséquence, les transitions optiques intraconfigurationnelles sont associées à des raies très fines. La section efficace d'absorption σ de la transition considérée à savoir la transition dipolaire électrique forcée $^7F_{0,1} - ^5D_2$ peut donc être mesurée précisément et la dispersion pour un ensemble de centres émetteurs reste réduite. Les NPs de $\text{Y}_{1-x}\text{Eu}_x\text{VO}_4$ ont été extensivement étudiées du point de vue chimique et spectroscopique par nos collaborateurs du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée à l'Ecole Polytechnique. Nous renvoyons également le lecteur à la thèse de Arnaud Huignard datant de 2001.^[37]

2.2.3 Variabilité du rendement quantique Q

Contrairement au taux d'excitation, le rendement quantique, Q , nécessitera une appréciation plus poussée. Après avoir présenté la méthode de détermination du rendement quantique, nous présenterons les résultats portant essentiellement sur la valeur du rendement quantique et du temps de vie du niveau excité des ions Europium en fonction du taux de dopage et du solvant considéré. Ceci nous permettra de savoir si tous les ions Europium possèdent le même rendement quantique. Cette étude est basée sur des résultats obtenus en partie par le LPMC mais les interprétations de ces résultats sont originales.

Détermination du rendement quantique

Tout d'abord, le rendement ne peut pas être mesuré facilement en excitant directement les ions Europium car le spectrofluorimètre dont nous disposons ne permet pas d'accéder précisément à des émissions faibles. L'équipe du LPMC détermine le rendement quantique en excitant les ions vanadates qui agissent alors comme groupements sensibilisateurs^[38]. Cette excitation provoque la création d'un exciton de Frenkel qui peut migrer thermiquement de site en site, puis être piégé par un ion Europium. Ce transfert d'énergie, vraisemblablement lié à une interaction d'échange, donne lieu à l'excitation des ions Europium dans un état 5D_i .

Ils se désexcitent de façon non-radiative par émission de phonons vers le niveau 5D_0 : c'est à partir de ce niveau que se produisent les transitions radiatives dont nous cherchons à estimer l'importance. Ainsi, après avoir démontré que le rendement de ce transfert était proche de 100% pour les taux de dopage autour de 30% (nous reviendrons sur ce point dans la suite), nous en avons conclu que le rendement basé sur une excitation des groupements vanadates était équivalent à celui basé sur une excitation directe.

De manière pratique, ce rendement est mesuré en comparant les intensités intégrées des signaux de luminescence d'une solution de référence et de l'échantillon à étudier pris dans les mêmes conditions expérimentales (longueur d'onde d'excitation fixée à 280 nm ; absorbances identiques et inférieures à 0.3). La solution de référence choisie par l'équipe du LPMC est la rhodamine 6G dans l'éthanol, dont le rendement quantique est de 96%.

Nous disposons donc d'une mesure précise du rendement quantique. Toutefois, puisque cette mesure est faite en solution sur un ensemble de NPs, nous ne savons pas encore si les différents centres émetteurs possèdent le même rendement. Pour répondre à cette question, nous nous proposons de revenir à la première définition de ce rendement, puis d'étudier l'influence du taux de dopage sur le rendement quantique.

Influence du taux de dopage, de la taille et de l'échange de solvant sur le rendement quantique

Afin de donner un cadre de réflexion à l'étude de ces influences, nous revenons sur l'une des définitions du rendement.

Ce rendement est défini comme le rapport entre la probabilité de transition radiative et la somme de celle radiative et non-radiative. Comme nous l'avons énoncé plus haut, au premier ordre, le taux radiatif ne doit pas dépendre de l'environnement puisqu'il est directement relié à la force d'oscillateur de la transition considérée peu sensible au champ cristallin. A contrario, le terme non-radiatif dépend fortement de l'environnement. Il peut-être décomposé, au premier ordre, en la somme de deux contributions, l'une symbolisant l'interaction entre les ions $k_{ion-ion}$ et l'autre celle entre les ions et leur environnement $k_{ion-env}$:

$$k_{nr} = k_{ion-ion} + k_{ion-env}. \quad (2.19)$$

• Interaction entre ions dopants

Etudions d'abord le premier terme. Il est utile d'observer comment se comporte le rendement quantique lorsque nous modifions le taux de dopage des NPs synthétisées par deux voies de synthèses différentes. La principale différence entre ces synthèses est que la distribution en taille des NPs obtenues par la voie citrate est plus étroite et centrée autour de 8 ± 3 nm alors que celle obtenue par la voie précipitation/redispersion est plus large et centrée autour de 35 ± 10 nm (données obtenues en MET).^[37] La figure suivante a été obtenue au LPMC.

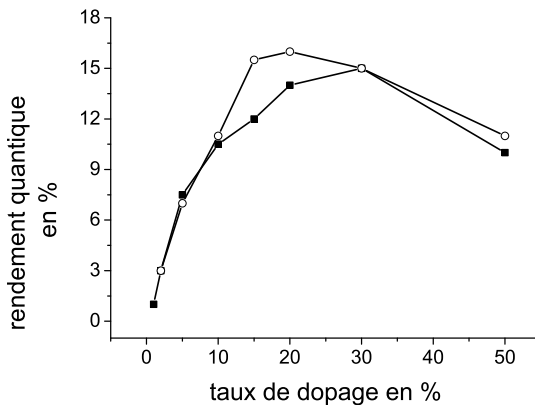


FIG. 2.2 – Rendement quantique des NPs synthétisées par la voie précipitation/redispersion (cercle vide) et par la voie de complexation par le citrate (carré plein) en fonction du taux de dopage en Europium. Figure extraite de la thèse de Arnaud Hui-gnard.^[37]

Deux points sont particulièrement intéressants dans ces résultats. Tout d'abord, nous remarquons qu'il existe un optimum de concentration, *i. e.* un taux de dopage pour lequel le rendement quantique est maximal et qui est, de plus, peu marquée (relativement au matériau massif). La diminution à fort taux de dopage résulte d'interactions entre les ions dopants sous au moins l'une des trois formes suivantes^[39] :

- L'énergie excitatrice est perdue depuis le niveau émetteur par des phénomènes de relaxation croisée entre les ions dopants. Ce phénomène se produit lorsque la différence d'énergie entre les deux niveaux mis en jeu dans le processus d'émission d'un ion dopant peut-être réabsorbée par un autre ion dopant à partir de son niveau fondamental.
- L'énergie excitatrice peut migrer au sein du solide par transfert d'énergie résonnant entre les ions dopants. La probabilité de rencontrer un piège de luminescence (défauts cristallins ou défauts de surface) augmente alors fortement, ce qui induit une diminution substantielle du rendement quantique.
- Les ions dopants peuvent s'apparier et former des centres non-luminescents.

Ainsi, à partir d'un certain taux de dopage, ces phénomènes deviennent prédominants et entraînent une diminution du rendement de luminescence : on parle alors d'extinction par

concentration. Le taux de dopage que nous utilisons classiquement se situe entre 20% et 40%, *i. e.* autour de l'optimum de concentration. Ainsi, pour ces dopages, l'effet d'extinction par concentration symbolisée par $k_{ion-ion}$ reste faible.

Dans tous les cas, cet effet ne nous aurait pas gêné puisque il n'y a aucune raison de considérer que son amplitude soit différente pour certaines NPs ou même pour certaines régions à l'intérieur d'une NP. Nous verrons cela dit dans la suite que l'incorporation des ions Europium lors de la synthèse se fait de manière homogène ce qui laisse penser que chaque ion est soumis à la même influence de la part de ses voisins. Ainsi, pour revenir à la question initiale, la part du rendement quantique rendant compte de l'interaction entre ions peut-être considérée comme invariante d'un centre émetteur à un autre. Toutes choses étant égales par ailleurs, cette contribution du rendement quantique mesurée sur un ensemble de NPs correspond donc à celle mesurée sur un centre émetteur.

- Interaction entre les ions dopants et leur environnement

Le deuxième point essentiel est que la Fig. 2.2 ne montre pas de changement significatif, compte tenu de l'erreur relative sur la mesure du rendement (de l'ordre de 10%), sur les rendements mesurés pour des tailles différentes de NPs, et ce quelque soit le taux de dopage. Ainsi, l'interaction entre ions dopants et environnement ne dépendra pas de la taille des NPs. Ce résultat est particulièrement important et indique que sur la gamme de tailles, typiquement de 10 nm à 50 nm que nous voulons mesurer optiquement il n'y aura pas d'erreurs systématiques sur la mesure du rendement et donc sur la mesure de la taille.

Ce point mérite d'être plus profondément interrogé tant il apparaît comme crucial mais aussi comme paradoxal.

- Extinction de la luminescence des ions Europium par les ions hydroxyles

En effet, les Europium sont bien connus pour avoir une émission qui peut être éteinte efficacement par les ions hydroxyles.^[40] Ce mécanisme a pour origine l'adéquation entre l'énergie de la troisième harmonique vibrationnelle de la liaison O-H des ions hydroxyles et la différence d'énergie entre le niveau émetteur et le niveau fondamental des ions Europium. Ainsi, par relaxation multiphonon, la luminescence des ions Europium peut être presque totalement éteinte. Ces ions étant évidemment présents dans tout solvant aqueux, on se serait attendu à ce que l'effet des hydroxyles sur les NPs de faible taille et donc sur le rendement soit beaucoup plus important que sur celles de taille plus importante. Nous allons dans la suite expliquer ce paradoxe apparent.

- Transfert des NPs dans le D_2O

L'équipe du LPMC a alors remplacé le solvant constitué d'eau simple par celui d'eau lourde (D_2O), le principe étant que cette fois ce n'est plus la troisième mais la cinquième harmonique qui est impliquée dans le processus non-radiatif ce qui diminue d'un facteur 200 l'efficacité du phénomène^[40]. Les résultats montrent que cet échange de solvant multiplie en moyenne par 2.1 ± 0.2 le rendement des NPs synthétisées par la voie précipitation/redispersion et par 2.3 ± 0.2 le rendement des NPs synthétisées par la voie citrate. On voit donc que malgré la différence de taille importante entre ces deux synthèses les résultats sont assez similaires. Ceci confirme donc le fait que le rendement quantique est indépendant de la taille mais ne permet toujours pas d'expliquer pourquoi.

Influence du taux de dopage, de la taille et de l'échange de solvant sur les temps de vie

Pour confirmer l'étude précédente, nous regardons à présent ces différentes influences sur les temps de vie. Les courbes suivantes ont été obtenues au LPMC par Arnaud Huignard à l'aide du spectrofluorimètre présenté précédemment.

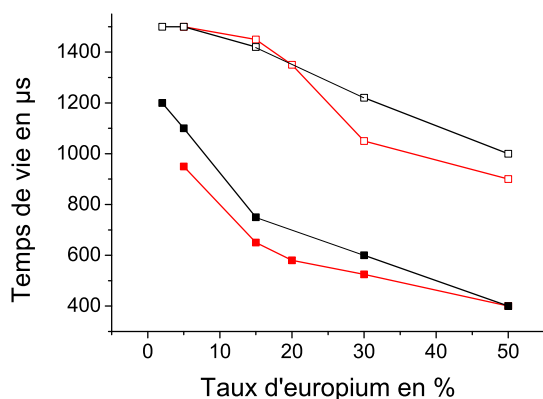


FIG. 2.3 – Temps de vie de l'émission des NPs synthétisées par la voie précipitation/redispersion (en rouge) et par la voie de complexation par le citrate (en noir); carré plein (vide) en présence de H_2O (D_2O). Figure extraite de la thèse de Arnaud Huignard.^[37]

Nous voyons tout d'abord que la forme des courbes en fonction du taux de dopage n'a pas la même allure que celles obtenues sur les rendements quantiques, notamment pour les faibles taux de dopage. Ceci s'explique par le fait que pour un dopage faible (moins de 20%) le transfert d'énergie entre ions vanadates et ions Europium se fait plus difficilement.

Les temps de vie de ces deux types de NP dans l'eau simple sont tout à fait semblables ce qui confirme la similarité des courbes de rendement obtenues pour les deux voies de synthèse

et donc pour les deux tailles. Pour la région de dopage qui nous concerne à savoir entre 20% et 40%, on retrouve un changement du temps de vie d'un facteur 2.2 ± 0.2 dans le cas des grosses NPs et d'un facteur 2.3 ± 0.2 pour les petites.

Les points importants dans ce propos sont d'une part que l'on retrouve dans les mesures de temps de vie l'amplitude de l'amélioration des rendements par transfert dans l'eau lourde et d'autre part que ce gain est peu différent selon les synthèses. Nous proposons dans la suite un modèle simple permettant d'estimer l'effet du transfert de solvant sur les rendements ainsi que des mesures de déclin de fluorescence plus précise que celle présentées précédemment qui nous permettront d'estimer les paramètres de ce modèle.

Modélisation simple du rendement quantique des NPs par deux systèmes de rendement différent

Après cette confirmation, revenons sur la valeur de ce gain de rendement. En remplaçant l'eau par du D_2O , nous observons une augmentation du rendement et du temps de vie d'un facteur deux. Pour tenter de clarifier ce point, nous proposons un modèle simple décrivant l'influence des ions hydroxyles sur le rendement des NPs.

La description théorique complète nécessiterait en fait de connaître la fonction $F(r)$, r étant la distance des ions Europium par rapport à la surface, représentant l'évolution du rendement quantique des centres émetteurs en fonction de leur distance par rapport à la surface. Supposons que cette fonction existe et est suffisamment continue, alors nous pouvons intégrer cette fonction sur deux ensembles distincts contenus dans la NP (le centre et la surface). Puisque nous ne pouvons en aucune façon accéder à cette fonction, nous raisonnerons par la suite directement sur ces deux ensembles.

Un premier ensemble ayant un rendement moyen de Q_a et représentant la fraction, a , des centres émetteurs en volume située au coeur de la NP ne subit pas du tout l'influence des groupements hydroxyles. Un second ensemble décrit par Q_b et b , *i. e.* $1-a$, et représentant la fraction des centres émetteurs en surface subit en revanche leur influence. De plus, i représentant les deux expériences avec (2) et sans D_2O (1), nous devons rajouter deux conditions : les deux rendements doivent être inférieurs à approximativement 0.3 et le rapport des rendements globaux Q_t^2 sur Q_t^1 doit être égal à deux car avec D_2O le rendement global est de 0.3 et sans

D_2O de 0.15 (Cf. Fig. 2.2).

$$a^i Q_a^i + (1 - a^i) Q_b^i = Q_t^i \quad (2.20)$$

$$\forall i \quad Q_a^i, Q_b^i \leq 0.3 \quad (2.21)$$

$$\forall i \quad Q_a^i, Q_b^i \geq 0 \quad (2.22)$$

$$\frac{Q_t^2}{Q_t^1} = 2 \quad (2.23)$$

Par construction, ce système se simplifie en :

$$a Q_a^1 + (1 - a) Q_b^1 = 0.15 \quad (2.24)$$

$$a Q_a^1 + (1 - a) Q_a^1 = 0.3. \quad (2.25)$$

$$(2.26)$$

De là, on déduit les trois relations suivantes :

$$Q_a^1 = 0.3 \quad (2.27)$$

$$Q_b^1 = 0.15 \frac{2b - 1}{b} \quad (2.28)$$

$$b \geq \frac{1}{2}. \quad (2.29)$$

Q_a^1 doit être égal à 0.3 puisque pour le coeur de la NP nous devons retrouver le résultat avec D_2O (absence d'influence des ions hydroxyles). La Fig. 2.4 rend compte de l'équation précédente.

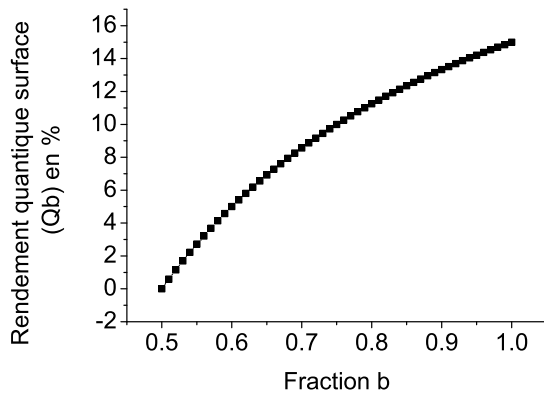


FIG. 2.4 – Modélisation de la dépendance du rendement quantique en fonction de la fraction des centres émetteurs de surface.

Forts de ces premiers ordres de grandeurs, nous pouvons aborder à présent l'étude sur les déclin de l'émission des ions Europium en fonction du temps dont l'allure pourra nous renseigner plus précisément sur l'importance relative de ces deux zones. Ceci nous permettra de comprendre, indirectement, pourquoi le rendement ne dépend pas de la taille des NPs.

Mesure des déclin de fluorescence

Pour quantifier précisément le déclin de fluorescence des ions Europium, nous avons monté notre propre système de détection. Brièvement, ce système est constitué d'une source laser Argon émettant à 466 nm, permettant d'exciter directement les ions Europium, d'un chopper mécanique tournant à 10000 tr/mn pourvu d'une pale possédant une zone pleine et une zone trouée, d'un système de lentille pour collecter puis focaliser l'émission des NPs contenues dans une cuve, d'un filtre interférentiel centré autour de la raie d'émission principale des ions Europium et enfin d'un photomultiplicateur relié à un oscilloscope numérique. Ce système nous permet de collecter précisément les photons émis lors du déclin de fluorescence sur une plage allant de 20 μs à 3000 μs après arrêt de l'excitation.

Il nous faut tout d'abord exprimer l'évolution du nombre de photons émis au cours du temps pour les deux ensembles (cœur et surface). Nous pouvons écrire de ce qui précède que le nombre de photons émis en régime stationnaire N_{ph}^{stat} pour un ensemble constitué de $N_{centres}$ équivalents en terme de rendement (par construction) est égal à :

$$N_{ph}^{stat} = N_{centres} \omega k_r \tau. \quad (2.30)$$

Lorsque l'on coupe l'excitation, le nombre de photons émis pour les deux ensembles décrits précédemment s'en déduit :

$$N_{ph}(t) = N_{centres} \omega k_r (a\tau_a e^{-\frac{t}{\tau_a}} + (1-a)\tau_b e^{-\frac{t}{\tau_b}}). \quad (2.31)$$

Par le même type de raisonnement que sur l'échange H_2O/D_2O dans le cas du rendement, on aboutit à la conclusion que τ_a doit être égal au temps de vie en présence de D_2O . Ceci équivaut dans le cas des NPs issues de la synthèse précipitation/redispersion à 1350 μs pour un dopage de 20% et à 1000 μs pour un dopage de 40% (cf. Fig. 2.3).

Il reste donc à savoir quelle est la véritable valeur de la fraction "a" qui, nous le rappelons

représente la fraction de centres émetteurs situées au centre de la NP, insensible à l'influence des hydroxyles de surface, et de valeur inférieure à 0.5.

Dans une première approche considérons que les déclin sont décrits par un seul type de centres émetteurs. Nous présentons dans les deux figures suivantes les déclin de fluorescence pour des NPs dopées 20% et 40% (grosses tailles) ainsi que les résultats des ajustements monoexponentiels associés. Compte tenu des valeurs des R^2 élevées : 0.9973 (20%) et 0.9982

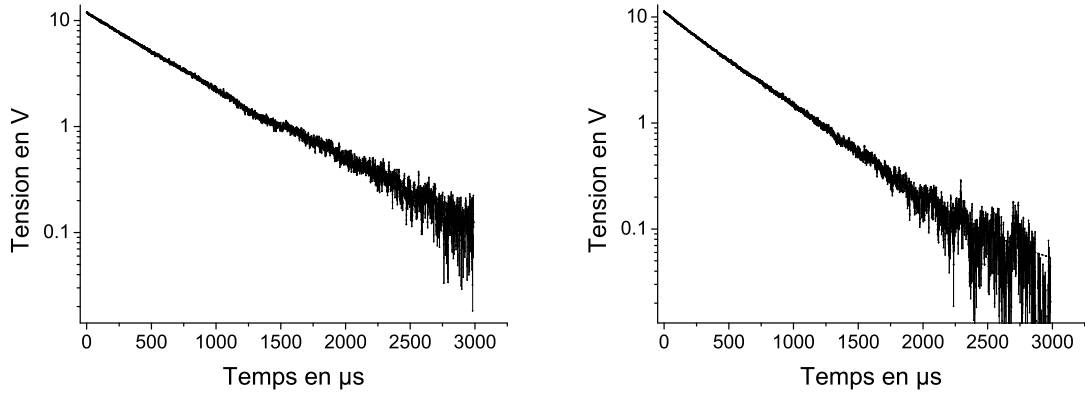


FIG. 2.5 – déclin de fluorescence pour des NPs dopées 20% (gauche) et 40% (droite), ajustements monoexponentiels : $588.2 \pm 0.8 \mu\text{s}$ pour 20% et $483.6 \pm 0.5 \mu\text{s}$ pour 40%.

(40%), nous pouvons déjà supposé que la fraction a représentant le coeur est faible.

Nous appliquons à ces déclin un ajustement décrit par la formule :

$$N_{ph}(t) = N_{ph}^0 (a\tau_a e^{-\frac{t}{\tau_a}} + (1-a)\tau_b e^{-\frac{t}{\tau_b}}) \quad (2.32)$$

$$a \leq \frac{1}{2}. \quad (2.33)$$

Pour les NPs dopées à 20%, l'ajustement converge vers un comportement entièrement monoexponentiel avec un temps de vie de $588.2 \pm 0.8 \mu\text{s}$. Pour les NPs dopées à 40%, l'ajustement converge vers une valeur pour la fraction a de $4 \pm 2\%$ et un temps de vie de $166 \pm 6 \mu\text{s}$ et pour la fraction b un temps de vie de $521 \pm 7 \mu\text{s}$. On observe donc dans les deux cas un comportement globalement monoexponentiel et qui ne présente aucunement un temps de vie proche de celui observé dans le cas des NPs introduites dans du D_2O . Ceci implique la conclusion majeure suivante : l'influence des ions hydroxyles se fait ressentir dans une zone de la NP beaucoup plus profonde que ce à quoi on aurait pu s'attendre. Ceci est à rapprocher des résultats obtenus sur les deux tailles de synthèse. Nous avons trouvé que pour des NPs

de taille de l'ordre de 8 nm et pour celles de 35 nm, les effets sur les rendements ou les temps de vie de l'échange de solvant étaient très similaires. Nous comprenons à présent pourquoi la distance caractéristique de pénétration de l'effet d'extinction par les hydroxyles étant élevée, au moins 10 nm, les NPs de différentes tailles ressentent de la même manière (ou quasiment) cette extinction de luminescence.

De manière plus physique, on peut se demander comment cette extinction peut se faire sur ces distances relativement importantes. Comme nous l'avions mentionné le mécanisme de quenching se fait par relaxation multi-phonons entre le niveau excité des ions Europium et les ions hydroxyles. Grâce à une propagation de l'excitation d'un site Europium à un autre, cette désexcitation non radiative par les ions hydroxyles peut également avoir une influence pour des excitations d'ions Europium localisées initialement au coeur de la NP.

2.2.4 Conclusions

Dans le but que nous nous étions fixé, à savoir éviter toute erreur systématique sur le calcul de la taille en raison du mécanisme de "quenching" provenant de la surface et donc dépendant de la taille, les résultats précédents étaient nécessaires. Il est important de souligner que ces résultats ne démontrent pas que les centres émetteurs sont rigoureusement équivalents, puisqu'il existe une distribution de distances entre centres émetteurs et surface. En revanche, comme la taille des NPs ne joue pratiquement pas, paradoxalement, de rôle dans l'importance de ce "quenching", nous pouvons considérer que le rendement quantique mesuré sur un ensemble de NPs est équivalent au rendement moyen d'une NP individuelle.

Cependant, les études menées par le LPMC et aussi par le LOB ont montré qu'il existait aussi un autre mécanisme important de baisse du rendement de luminescence. Les données obtenues par diffraction des rayons X (RX) ont révélé que dans le cas de la synthèse par précipitation puis redispersion, les dimensions des domaines monocristallins étaient bien plus faibles que les tailles de NPs révélées en MET. Il est donc apparu clairement que la synthèse de ces NPs se faisait par agrégations successives d'entités primaires de tailles caractéristiques correspondant aux données de RX. De plus, la présence de nombreux défauts cristallins au sein des NPs implique la présence de voies de recombinaison non-radiatives supplémentaires ce qui diminue d'autant le rendement quantique. Ceci pourrait poser problème si la densité de défauts n'était pas indépendante de la taille. Or, comme nous venons de l'indiquer, ces

défauts se situent dans tout le volume de la NP, il n'y a donc pas de raison de penser que la densité de défauts dépende de la taille. Nous discuterons plus dans le détail l'importance de ces défauts cristallins dans le chapitre 3.

Ainsi, avec une certaine sérénité, nous pouvons écrire que le nombre de photons émis par NP, constituée de $N_{centres}$ pouvant être considérés comme équivalents, se déduit bien de celui émis par un centre émetteur unique par la relation suivante :

$$N_{ph} = N_{centres} \omega Q (1 - e^{-\frac{T}{\tau_{pr}}}) \tau_{pr}. \quad (2.34)$$

Enfin, le $N_{centres}$ pour une NP de rayon R peut alors être facilement trouvé en notant que chaque maille cristalline contient 4 ions vanadates et 4 ions Europium pour un dopage de 100%. Le volume "V" de la maille cristalline a été mesuré par analyse de la diffraction des rayons X au LPMC^[37]. Plus précisément, l'équipe du LPMC a vérifié que l'incorporation des ions Europium dans la matrice cristalline est homogène et quantitative comme l'ont montré la variation linéaire du volume de la maille cristalline en fonction du taux de dopage x (loi de Vegard). Cette quantitativité de l'incorporation est liée au fait que les réactivités chimiques et les rayons ioniques des ions Yttrium et Europium sont proches.

Ainsi, le nombre de photons détectés pendant l'intervalle de temps [0,T] se déduit du nombre de photons émis en tenant compte de l'efficacité de détection η du montage optique et s'écrit :

$$N_{ph}^{Det} = \frac{16 \pi x \omega Q \eta R^3}{3V} (1 - e^{-\frac{T}{\tau_{pr}}}) \tau_{pr}. \quad (2.35)$$

2.3 Distribution de la taille des NPs calculée par voie optique

2.3.1 Traitement d'images

Nous voulons à présent connaître, expérimentalement, le nombre de photons émis par NP afin de remonter à leur taille. Dans ce but, nous réalisons un dépôt à la tournette des NPs sur une lamelle de microscopie. Nous réglons précisément la quantité de NPs déposée afin d'avoir sur la lamelle des NPs bien séparées spatialement.

L'image suivante correspond à un dépôt des NPs déposées sur une lamelle en silice recou-

vertes d'un solvant aqueux (tampon phosphate) et observées à l'aide de notre montage de microscopie de fluorescence en champ large.

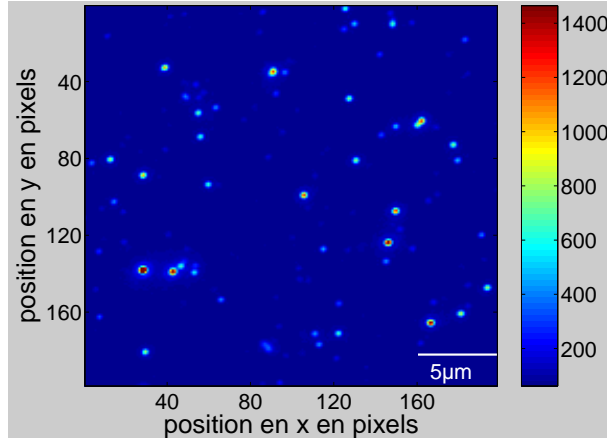


FIG. 2.6 – Image typique de NPs observées en microscopie de fluorescence plein champ.

Sur cette image, on voit clairement de nombreux points lumineux correspondants à des NPs uniques, nous reviendrons sur ce point dans la suite.

On observe aussi que la distribution du nombre de photons par NP est large. Typiquement, pour des intensités d'excitation de 3 kW.cm^{-2} et des temps d'exposition de 500 ms, cette distribution s'étend de 50 coups à plus de 2000 coups. Cet ordre de grandeur est donné pour les NPs que nous allons plus spécialement examiner par la suite mais, en réalité, on atteint couramment avec des synthèses plus récentes et dont le rendement quantique est nettement plus élevé des nombres de coups au moins supérieurs d'un facteur 4.

Dans la mesure où nous souhaitons obtenir une statistique importante de NPs et disposer d'une méthode rapide et reproductible, le recours à une procédure de traitement d'images robuste s'impose. De plus, ce traitement doit pouvoir convenir à une large variété de signal de fond. A ce propos, nous définissons le signal de fond comme issu de toutes les sources de photons qui ne proviennent pas des NPs. Essentiellement, ce signal de fond a pour origine la fluorescence de la lamelle de verre. Nous appelons de plus "spot", la tache de diffraction associée putativement à une NP unique. Pour les conditions mentionnées précédemment, le signal de fond est proche de 400 coups. Ainsi, nous devons traiter des signaux qui peuvent être relativement faibles. Il faut en plus que l'on soit capable dans ces cas de faibles signaux de déterminer précisément quelle erreur nous commettons dans leur mesure et d'éviter toute erreur systématique liée à l'amplitude des signaux.

Le traitement d'images est présenté dans l'annexe A ainsi que la détermination de l'efficacité de ce traitement. Brièvement, la technique de traitement employée est basée essentiel-

lement sur un filtrage laplacien qui permet d'accéder aux fluctuations du signal de fond. Le seuillage qui en découle permet de complètement s'affranchir des caractéristiques de la distribution du nombre de photons émis par les NPs. Pour quantifier l'efficacité de cette approche, nous avons utilisé des images théoriques reproduisant fidèlement les images expérimentales. Nous avons quantifié les erreurs sur la mesure du nombre de photons et comparé, favorablement, les distributions théoriques et calculées et ce même en présence de NPs dont le rapport signal sur bruit est faible. Ceci a abouti à un programme robuste et entièrement automatique.

Nous étudions à présent la distribution réelle d'une synthèse de NPs obtenue par le LPMC. Pour valider la méthode permettant de calculer les tailles de NPs par voie optique, nous comparerons la distribution en tailles obtenue par microscopie optique à celle obtenue par microscopie électronique en transmission.

2.3.2 Comparatif des distributions obtenues par MET et par voie optique

Nous nous intéressons tout d'abord à la distribution en tailles obtenue en microscopie électronique en transmission. Pour se faire, l'équipe du LPMC a utilisé un microscope Philips CM 30 opérant à 30 keV et possédant une résolution de 0.235 nm et déposé sur une grille de cuivre recouverte d'une peau de carbone une goutte de solution de NPs dopées à 40% puis chauffées à 120° afin d'évaporer le solvant. Le lecteur pourra trouver les détails de la synthèse et de ce qui va suivre dans notre article paru en 2006^[25].

Du fait de l'aggrégation des NPs lors du dépôt, nous avons mesuré manuellement les tailles des NPs en rejetant toutes les taches suspectées d'être des agrégats de NPs. La figure suivante montre l'histogramme des diamètres déduit de ces mesures. Notons tout d'abord que ces NPs sont de forme elliptique. Ainsi, pour avoir accès au diamètre moyen des NPs nous faisons l'hypothèse que le diamètre en z est égal au diamètre du cercle dans le plan xy de surface égale à la surface de l'ellipse. Ceci revient à moyenner les deux axes de l'ellipse puis à supposer que le troisième axe est égal à cette moyenne permettant ainsi de minimiser l'erreur sur son estimation (si nous considérons que l'axe en z est égal cette fois à l'axe transverse, nous obtenons une différence de 1.5 nm au niveau du pic de la distribution). Nous observons sur cet histogramme que le pic se situe autour de 16 nm et que la distribution en tailles est relativement large comparée à des distributions de quantum dots ou des NPs métalliques.

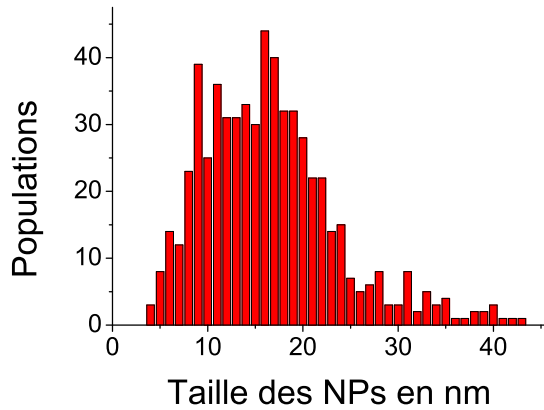


FIG. 2.7 – Histogramme en tailles de NPs ($N = 603$) obtenues en microscopie électronique en transmission.

D'autre part nous mesurons, la distribution en luminosité de ces mêmes NPs déposées par spincoating sur une lamelle de quartz et à l'aide de notre montage classique, champ large en épifluorescence.^[25] Nous appliquons la procédure décrite en annexe A avec un n_{sigma} égal à 2.5 ce qui manifeste la valeur du seuil utilisé pour différencier les zones de NPs de celles sans NPs. Pour ce type de NPs ayant un rendement quantique faible de 6.8%, l'histogramme obtenu présente un seuil provenant très certainement du bruit de fond.

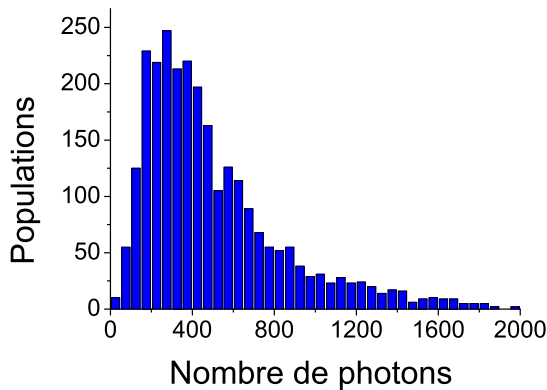


FIG. 2.8 – Histogramme en luminosité de NPs ($N = 2719$) obtenues en microscopie optique, $T_{exposition} = 500ms$, $I_{inc} = [2.8, 4.4] kW.cm^{-2}$, images de 200X200 pixels.

Nous voulons ensuite transformer cette distribution en luminosité en distribution en tailles. Nous rappelons ici la relation donnant le nombre de photons détectés pendant l'intervalle de temps $[0, T]$:

$$N_{ph}^{Det} = \frac{16 \pi x \omega Q \eta R^3}{3V} (1 - e^{-\frac{T}{\tau_{pr}}}) \tau_{pr} \quad (2.36)$$

Les différents paramètres sont connus et valent : $x = 0.4$, $\omega = \frac{\sigma I_{inc}}{h\nu}$ avec $\sigma = 1.41 \times 10^{-21} cm^{-2}$, $I_{inc} = [2.8, 4.4] kW.cm^{-2}$ et $h\nu = 2.66 eV$, $Q = 0.068$, $\eta = 0.096$, $V = 0.323 nm^3$. Le terme

correctif restant lié à la photo-réduction des Europium, ainsi d'ailleurs que l' I_{inc} , a été mesuré pour chaque NP et vaut typiquement 1.43 ± 0.10 . Comme nous l'avons montré, chacun de ces paramètres ne présentant pas de variabilité liée à la taille des NPs, on peut déduire précisément la taille associée à chaque nombre de photons.

Nous comparons dans la Fig. 2.9 les deux histogrammes obtenus par microscopie électronique (MET) et optique (MO). L'accord est relativement bon excepté pour les petites NPs. Nous tenons compte dans la figure de droite de l'efficacité de détection calculée cette fois sur les tailles et appliquée à l'histogramme en tailles obtenues par MET (Cf. annexe A). Cette fois l'accord est tout à fait excellent. Les quelques NPs de fortes tailles trouvées en MET représentent certainement des agrégats de NPs.

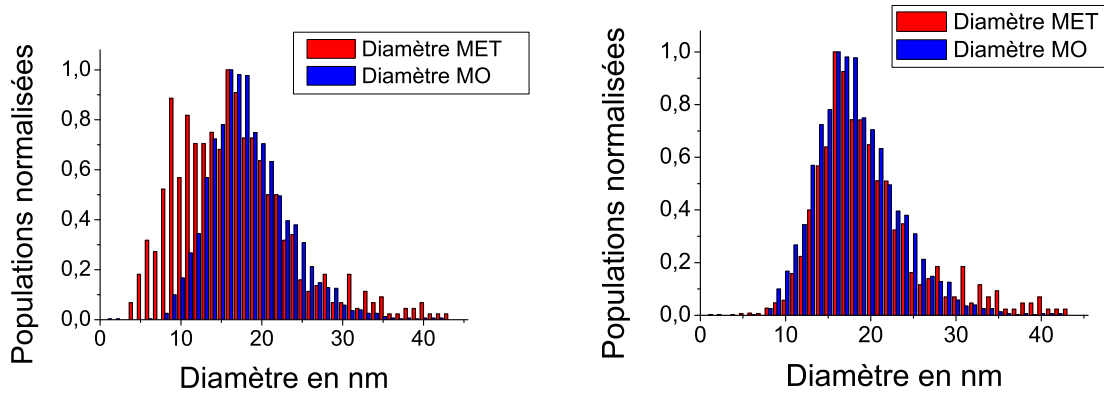


FIG. 2.9 – Histogrammes en tailles obtenues à partir des images de MET (rouge) et de MO (bleu) avec (droite) et sans (gauche) calcul d'efficacité de détection.

Si nous ajustons ces deux distributions par deux gaussiennes nous trouvons une erreur sur la position du pic de 1% et sur la largeur à mi-hauteur une erreur de 9%. La véritable précision est en réalité moins bonne dans la mesure où il faut tenir compte des erreurs d'une part sur la mesure des paramètres de l'équation donnant le nombre de photons détectées (essentiellement le rendement quantique) et d'autre part sur celles liées aux programmes de traitement d'images. Nous avons alors calculé que l'erreur moyenne sur la détermination de la taille est en fait plus proche de 10%. Nous avons enfin vérifié que si nous décalions la distribution obtenue par TEM de seulement 3 nm et que nous appliquons l'efficacité de détection puis la normalisation des populations ce qui peut-être source d'artefact, nous obtenions des courbes réellement différentes.

2.4 Conclusions

Au cours de ce chapitre, nous avons démontré que nous pouvions précisément mesurer la taille de NPs individuelles en se basant sur un calcul simple du nombre de photons émis par NPs et en accordant une attention toute particulière aux diverses sources d'extinction de la luminescence et au programme de traitement d'images. La précision finale de la mesure est tout à fait satisfaisante compte tenu du rapport signal sur bruit de ces NPs. Cette méthode nous permet donc d'atteindre les deux buts que nous nous étions fixés à savoir que cette méthode soit simple d'application et automatique et en même temps qu'elle permette de s'assurer que, *in situ*, nous observons bien des NPs uniques. D'ailleurs, on peut de manière triviale considérer que le gain de temps associé à cette méthode est de l'ordre d'un facteur vingt compte tenu du fastidieux alignement du microscope électronique et de la nécessité de mesurer manuellement les NPs du fait de l'aggrégation des NPs sur la grille de MET.

Cette méthode ouvre de plus des perspectives nouvelles. Au delà de son utilisation pour d'autres types de NPs à plusieurs centres émetteurs, on pourra par exemple voir l'influence réelle de la taille des NPs sur la dynamique de protéines membranaires ou intra-cellulaires.

Une fois que la séparation en tailles à l'aide de colonnes d'exclusion sera au point, nous pourrons réaliser une nouvelle technique de séparation de plusieurs biomolécules marquées. En effet, nous pourrions tout à fait séparer, par la mesure du nombre de photons émis par NPs, des NPs de tailles différentes et marquant des biomolécules différentes. Ceci permettrait, par exemple, de faire du suivi simultané de NPs individuelles et ainsi d'augmenter la fréquence d'observation des trajectoires dans la mesure où actuellement pour réaliser un suivi de plusieurs biomolécules nous sommes contraints de les marquer avec des fluorophores ou des NPs semiconductrices de spectres d'émissions différents ce qui nécessite d'enregistrer à chaque fois une image pour ces différentes couleurs.

Enfin, de manière plus fondamentale, pouvoir coupler une mesure de tailles avec d'autres paramètres photophysiques tels que le photoblanchiment ou l'extinction de luminescence semble tout à fait intéressant.

Chapitre 3

Photophysique des nanoparticules de $\text{YVO}_4:\text{Eu}$

3.1 Introduction

La photophysique des fluorophores qu'ils soient organiques ou inorganiques a été largement étudiée depuis de nombreuses années. Elle consiste principalement en l'étude des mécanismes d'absorption et de relaxation d'un atome, d'une molécule ou d'un composé plus complexe soumis à une excitation sous forme d'onde lumineuse. Elle couvre une large variété de phénomènes qui peuvent être rassemblés sous le terme d'interaction rayonnement-matière. La matière est symbolisée par des niveaux d'énergie discrets ou continus qui définissent les transitions permises sous l'effet du rayonnement. La photophysique s'intéresse essentiellement aux mécanismes de relaxation du niveau excité. Différentes relaxations peuvent être envisagées sous la forme de processus radiatif ou non-radiatif. Ces processus sont généralement classés selon leur nature réversible ou irréversible *i.e.* selon que la matière retrouve ou non son niveau fondamental ou excité d'avant absorption.

Dans cette introduction, nous souhaitons brièvement présenter la photophysique des fluorophores. Cette présentation se fera sous l'angle limité, partial mais très éclairant du fluorophore organique Cy5. Nous nous attacherons à démontrer que ces études sur la photophysique peuvent aboutir à des applications importantes et notamment dans le domaine de l'imagerie cellulaire.

Pour modéliser la photophysique des fluorophores organiques, il est intéressant de présenter

le diagramme simplificateur de Jablonski.^[41] Nous trouvons dans ce diagramme les niveaux singulets, fondamental (S_0) et excité de la molécule (S_1), et le niveau triplet de la molécule (T_1).

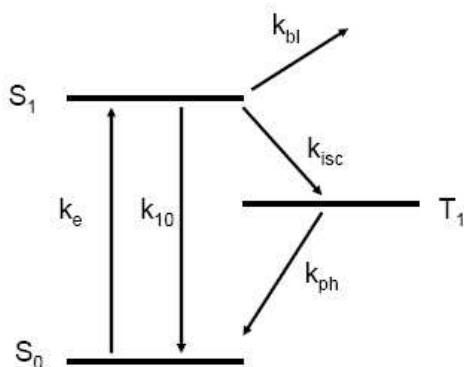


FIG. 3.1 – Diagramme de Jablonski montrant les principales transitions photophysiques d'une molécule fluorescente typique. Figure extraite de la référence^[41].

Dans ce diagramme, sont indiqués les constantes de réaction associées aux différentes transitions. La transition de S_0 à S_1 est caractérisée par la constante k_e qui dépend de l'intensité de l'onde lumineuse et du coefficient d'absorption (Cf. chap.2). La transition inverse (constante k_{10}) aboutit à l'émission de la fluorescence. La constante k_{isc} représente la constante de conversion intersystème (état singulet vers état triplet) et on associe généralement au processus inverse la constante k_{ph} . La transition irréversible dite de photoblanchiment est représentée par la constante k_{bl} . Il est important de noter que derrière ces constantes se cachent pour une molécule donnée une multitude de phénomènes et qu'elles doivent donc être considérées comme des constantes effectives. Selon la molécule, le photoblanchiment peut correspondre à une isomérisation, à une annihilation entre états triplets, à une dissociation de la molécule...^[?]

Nous prenons dans la suite l'exemple du Cy5, un fluorophore organique très largement utilisé en biologie cellulaire pour le marquage de protéine.

Widengren et Scwhille en 2000 ont quantifié à l'aide de la technique par corrélation de fluorescence la transformation du Cy5 de la forme trans vers cis sous excitation laser ainsi que la transformation inverse^[42]. Notons que cette transformation est en fait connue depuis les années 70.^[43]

On voit apparaître dans la figure suivante à côté des niveaux singulets et triplets de la forme trans les niveaux d'énergie dus à la forme cis du Cy5. Il faut bien noter que les niveaux d'énergie présentés dans ce diagramme ne sont qu'une forme simplifiée des véritables niveaux d'énergie. Le même groupe a présenté sur la GFP, une protéine fluorescente, des résultats

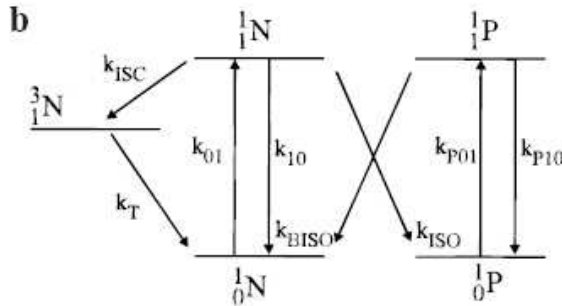


FIG. 3.2 – Schéma énergétique simplifié du fluorophore Cy5 où 1_0N , 1_1N et 3_0N représente respectivement l'état singulet fondamental, le premier état singulet excité et le premier état triplet de la conformation native du Cy5 (trans). De même, 1_1P et 1_0P sont les états correspondants pour la forme photo-induite cis. Figure extraite de la référence^[42]

similaires montrant deux isomérisations photo-induites possibles ainsi qu'un autre état indépendant de l'illumination.^[44] Ainsi, nous pouvons tirer la première conclusion suivante : en plus des niveaux d'énergie classiques qui peuvent être déterminés par des mesures de spectre d'absorption, d'excitation ou d'émission se cache selon la molécule étudiée un ensemble de niveaux d'énergie qui peuvent soit être présents avant l'illumination laser soit apparaître du fait de cette illumination.

De manière simultanée, les groupes de Tinnenfeld et Zhuang ont découvert une nouvelle propriété photophysique du Cy5.^[45;46] Le groupe de Tinnenfeld a démontré que le Cy5 pouvait être rendu de nouveau fluorescent, après un photoblanchiment apparent, en utilisant une longueur d'onde d'excitation inférieure à celle utilisée au départ pour exciter la molécule. Ainsi, en alternant les longueurs d'onde d'excitation, le Cy5 peut être à volonté rendu fluorescent (cf. Fig. 3.3). De cette propriété, ils ont déduit que le Cy5 pouvait être un candidat

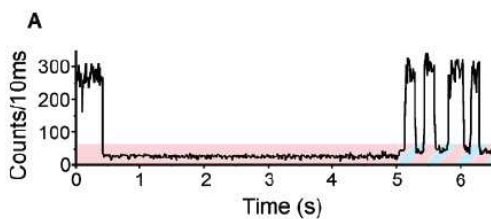


FIG. 3.3 – Fluorescence détectée pour un Cy5 unique, illuminé pendant 5 s à 633 nm (14 kW/cm²) puis simultanément à 633 nm et 488 nm (même puissance, zones bleues), puis à nouveau uniquement à 633nm (zones rouges)... Figure extraite de la référence^[46]

prometteur pour le stockage de données sous forme optique. L'application qui a retenu, plus particulièrement, notre attention est celle proposée par l'équipe de Zhuang. Cette équipe est allée plus loin en notant que la transformation entre l'état non-fluorescent et celui fluorescent pouvait être activée par un facteur 100 lorsque un Cy3, un autre fluorophore organique du type cyanine, se situe dans l'environnement proche (1-3 nm) du Cy5 et que cette activation dépendait de la distance entre les deux fluorophores. La première application envisagée fût de sonder les changements de conformation d'un ribozyme en accrochant le Cy5 et le Cy3 sur

deux parties du ribozyme susceptibles de se rapprocher lors du changement de conformation. Même si le mécanisme de transformation du Cy5 reste largement incompris, ils ont pu démontrer que la gamme de distances pouvant être résolus par cette approche était inférieure à ce que permettent les expériences de FRET (Cf. chap. 4). Nous voyons donc que deux applications très prometteuses issues d'une propriété photophysique particulière ont été proposées, de notre point de vue la plus impressionnante reste à présenter.

L'équipe de Zhuang a en effet montré que ce conjugué Cy5-Cy3 pouvait servir à obtenir une résolution dans des expériences de microscopie optique bien inférieure à la limite par diffraction.^[47] Cette équipe a montré qu'en activant cycliquement et aléatoirement la fluorescence de différents conjugués situés dans un même spot de diffraction, chaque position des conjugués pouvait être déterminée avec une précision de 20 nm (technique de "Stochastic Optical Reconstruction Microscopy"). Nous montrons dans la figure suivante une image de microtubules marqués par ce type de conjugué et obtenue soit par microscopie de fluorescence soit par STORM.^[48]

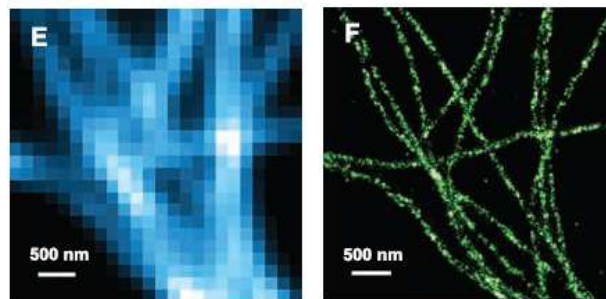


FIG. 3.4 – A gauche : image de fluorescence de microtubules de cellules de mammifère (BS-C-1) par microscopie TIRF (Total internal reflection fluorescence) A droite : image de la même région mais obtenue par STORM. Figure extraite de la référence^[48]

Nous avons voulu montrer dans cette brève introduction que l'étude des propriétés photophysiques peut engendrer des idées fécondes desquelles peuvent jaillir des applications surprenantes et prometteuses. Nous essaierons dans la suite de suivre, modestement, le même type de cheminement allant de l'étude *stricto sensu* des propriétés photophysiques essentiellement de photoblanchiment jusqu'à l'application en termes de nanosenseurs en milieu biologique (Cf. chap. 6).

3.2 Etude du photoblanchiment des nanoparticules de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$

Nous présentons dans cette partie les résultats obtenus sur le photoblanchiment des NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$. Nous appellerons dans un premier temps photoblanchiment le phénomène photophysique caractérisé par une diminution de la photoluminescence au cours du temps. Nous détaillerons quelques propriétés générales de ce photoblanchiment. Nous déduirons d'expériences spectroscopiques et d'oxydo-réduction que ce photoblanchiment est en fait une photo-réduction des ions Europium. Nous aborderons ensuite la nature de l'espèce réductrice qui induit cette photo-réduction. Nous interpréterons l'ensemble des résultats dans un cadre unifié et déduirons dans la partie suivante un modèle cinétique de ce photoblanchiment. Enfin, nous confronterons notre modèle aux données expérimentales. Du point de vue méthodologique, cette présentation se fera sous forme de résultats numérotés et relativement indépendants du moins dans un premier temps.

3.2.1 Propriétés générales

Les expériences qui vont suivre sont, sauf mention contraire, effectuées dans les conditions suivantes :

- dépôt à la tournette de NPs sur une lamelle de silice, lamelle placée dans un support contenant une solution de tampon phosphate (pH=7.4, 20 mM),
- densité de NPs réglée afin d'avoir clairement des NPs bien individualisées,
- NPs excitées à l'aide de la raie Argon à 465 nm et observées à l'aide de notre dispositif classique de microscopie plein champ en sélectionnant l'émission des ions Europium à 617 nm.

Les courbes de photoluminescence (PL) normalisées à la première valeur enregistrée ont typiquement la forme montrée dans la Fig. 3.5.

Nous allons dans la suite décrire en détail ce photoblanchiment.

Caractère multi-exponentiel

Nous montrons dans les figures suivantes la même courbe de photoblanchiment présenté sur une échelle logarithmique soit pour la PL soit à la fois pour la PL et le temps.

Il est évident sur la figure de gauche que le photoblanchiment est fortement multi-exponentiel. La figure de droite indique qu'une fonction en $t^{-\beta}$ pourrait convenir pour décrire cette courbe.

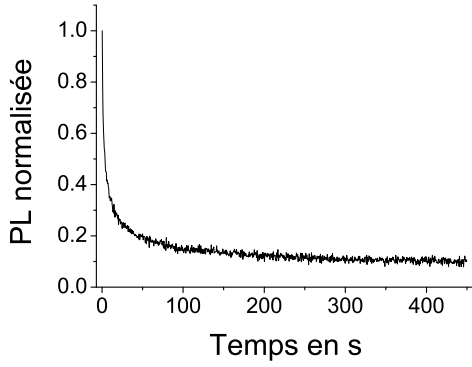


FIG. 3.5 – Photoluminescence (PL) détectée à 617 nm d'une NP individuelle en fonction du temps. $I_{inc} = 15 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$, NPs dopées à 10%, $Q = 10\%$.

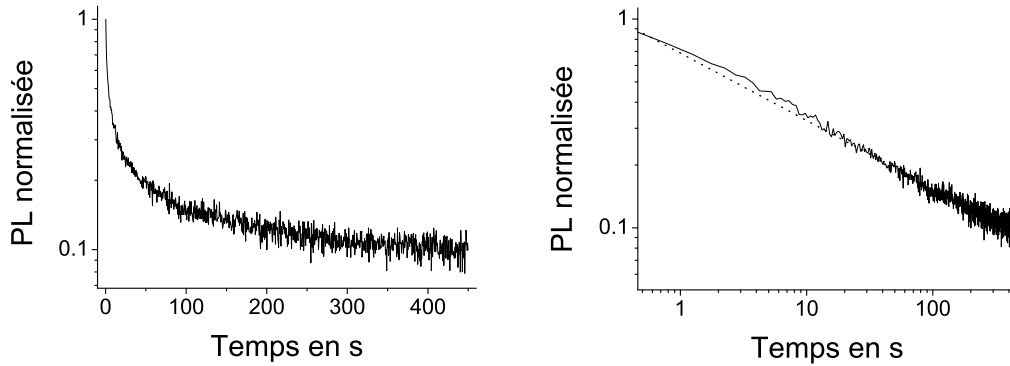


FIG. 3.6 – Courbes de PL présentées en fonction du log du temps (à gauche) ou en log/log (à droite). Sur la courbe en log/log est indiqué à titre indicatif un fit linéaire. $I_{inc} = 15 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$, NPs dopées à 10%, $Q = 10\%$.

Nous y reviendrons.

Nous montrons dans les graphiques suivants les résidus obtenus en ajustant cette courbe avec une fonction bi-exponentielle avec et sans valeur constante, tri-exponentielle ou quadri-exponentielle. Un moyennage par un filtre glissant de dimension 5 a été appliqué afin d'enlever les fluctuations à haute fréquence dues aux fluctuations poissonniennes du signal de PL.

Pour ces durées d'acquisition, on observe clairement sur ces figures que les ajustements deviennent corrects à partir de 3 exponentielles. Les paramètres des ajustements indiquent que la gamme de constantes de temps s'étend de 0.65 s à plusieurs centaines de secondes. On peut vérifier sur de nombreuses NPs individuelles que cette gamme de constantes de temps s'étendant sur trois ordres de grandeur est tout à fait typique pour ces conditions expérimentales.

Il est utile pour décrire ce type de distributions larges de faire un détour par les techniques employées pour décrire les déclin de luminescence du niveau excité des fluorophores.

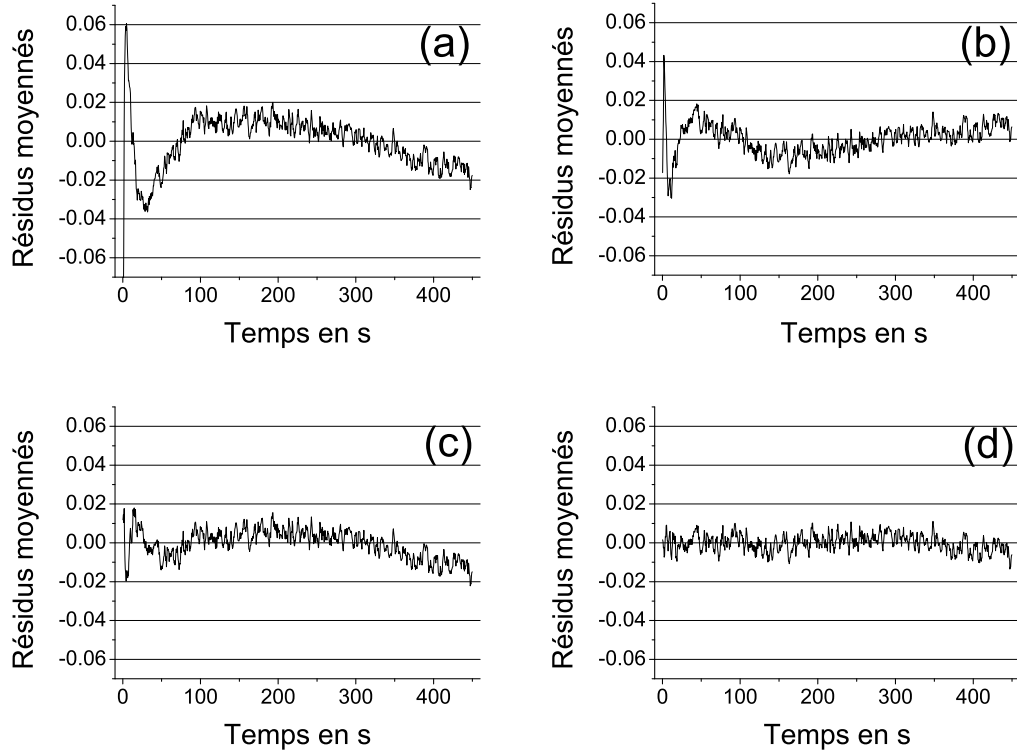


FIG. 3.7 – Résidus moyennés obtenus par les ajustements avec des fonctions (a) bi-exponentielles avec ($A_1 = 0.59$, $T_1 = 3.46$ s, $A_2 = 0.39$, $T_2 = 234$ s, $A_0 = 0.11$) et (b) sans ($A_1 = 0.55$, $T_1 = 8.8$ s, $A_2 = 0.19$, $T_2 = 546$ s) valeur constante, (c) tri-exponentielles ($A_1 = 0.57$, $T_1 = 1.6$ s, $A_2 = 0.29$, $T_2 = 19.6$ s, $A_3 = 0.18$, $T_3 = 635$ s) et (d) quadri-exponentielles ($A_1 = 0.45$, $T_1 = 0.65$ s, $A_2 = 0.35$, $T_2 = 5.8$ s, $A_3 = 0.17$, $T_3 = 41$ s, $A_4 = 0.15$, $T_4 = 1015$ s).

En effet, depuis quelques années, on assiste à une recrudescence d'intérêt pour des moyens théoriques permettant de décrire, plus finement qu'un ajustement multi-exponentiel, des courbes de déclin de luminescence. Des distributions de constante de temps ont été observées dans des systèmes aussi variés que des fluorophores incorporés dans des micelles ou déposées sur des surfaces, des matrices sol-gel, des polymères, des vésicules, membranes ou plus généralement des tissus biologiques...^[49] Dans tous ces cas, une distribution de constantes de réaction, $H(k)$, peut être employée à la place d'une somme discrète d'exponentielles. Le nombre de photons émis après arrêt de l'illumination, $N(t)$, s'écrit alors :

$$N(t) = \int_0^\infty H(k)e^{-kt} dk. \quad (3.1)$$

$H(k)$ représente alors la transformée de Laplace de $N(t)$. Cependant, la connaissance de $N(t)$ n'engendre pas automatiquement celle de $H(k)$: ceci est le problème connu de l'inversion de

Laplace. Une légère fluctuation de $N(t)$ entraîne une déviation arbitrairement large de $H(k)$. Dans la mesure où généralement $N(t)$ est bruitée, on comprend que la mesure de $H(k)$ par cette méthode peut se retrouver inexacte voire carrément fausse.

Pour surmonter cette difficulté, Berberan-Santos *et al* ont classifié trois approches différentes^[49] :

- la première, celle que nous essaierons de suivre dans la partie interprétation, est de proposer un modèle sous-jacent décrivant le déclin de fluorescence
- la deuxième, utilisé notamment par le groupe de Zhuang,^[50] est d'analyser les données ($N(t)$) sans connaître à priori la forme de $H(k)$,
- la troisième est d'ajuster les données avec une fonction pour laquelle on connaît la forme de $H(k)$.

Nous allons à présent suivre la troisième approche.

Il existe essentiellement deux fonctions qui ont été utilisées pour décrire les courbes de déclin de fluorescence.

- La première est celle de Kohlrausch, ou exponentiel étirée, donnée par :

$$N(t) = N_0 \exp(-(t/\tau_0)^\beta) \quad 0 \leq \beta \leq 1 \quad (3.2)$$

Elle a notamment été utilisée dans le cas des déclins des nanoparticules poreuses de silice pour lesquelles des temps allant de 10^{-9} à 10^{-2} s ont été observés.^[51] Il est admis que cette fonction décrit en général un certain désordre à l'intérieur de la structure et en particulier (NPs de silice) une dispersion des constantes de diffusion des porteurs de charge photo-excités.^[49]

Cependant, cette fonction ne peut pas être ajustée à nos données. En exprimant le logarithme du logarithme de $1/N$ en fonction du logarithme du temps, nous devons retrouver une dépendance linéaire. La courbe suivante basée sur la PL précédente indique bien cette non-linéarité.

- La seconde fonction est celle de Becquerel (loi de puissance) d'équation :

$$N(t) = \frac{N_0}{(1 + (1 - \beta) \frac{t}{\tau_0})^{\frac{1}{1 - \beta}}}. \quad (3.3)$$

Cette fonction a été utilisée par Becquerel dans le cadre du déclin de luminescence des phosphores pour lesquelles les phénomènes de piégeage sur des sites de profondeurs différentes

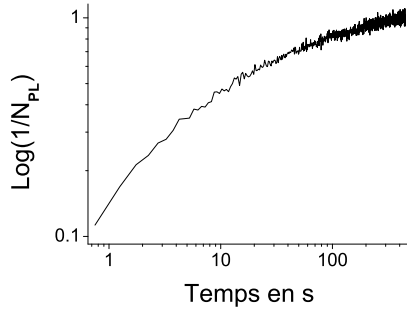


FIG. 3.8 – Courbe de PL présente en log-log de l'inverse de N (nombre de photons détectés) et log du temps (même NP que précédemment). $I_{inc} = 15 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$, NPs dopées à 10%, $Q = 10\%$.

et de dépiégeage entraînent l'apparition d'une large gamme de constantes de temps.^[52] Plus récemment, le groupe de Kierdaszuk l'employa pour décrire les déclin des résidus de tyrosine et de tryptophane de différentes protéines.^[53]

Cette fonction semble être plus justifiée mathématiquement que l'exponentielle étirée puisqu'elle résulte d'un calcul de maximisation d'entropie pour la distribution $H(k)$. Plus exactement, si on se donne une distribution $H(k)$ inconnue, le fait de maximiser l'entropie S associée à cette distribution, définie comme :

$$S = - \int H(\kappa) \ln(H(\kappa)) d\kappa, \quad (3.4)$$

permet de calculer quelle est la distribution la plus probable. Le calcul montre que la distribution des constantes de réaction, $H(k)$, résultant de cette maximisation peut s'écrire sous la forme^[52] :

$$H(k) = \frac{\left(\frac{1}{1-\beta} \frac{k}{\langle k \rangle}\right)^{\frac{\beta}{1-\beta}} \exp\left(-\frac{1}{1-\beta} \frac{k}{\langle k \rangle}\right)}{(1-\beta) \langle k \rangle \Gamma\left(\frac{1}{1-\beta}\right)} \quad (3.5)$$

$$\langle k \rangle = \int_0^\infty k H(k) dk \quad (3.6)$$

où $\langle k \rangle$ représente la constante de réaction moyenne. Cette constante peut être calculée en notant que :

$$\langle k \rangle = -\frac{dN}{dt}(0) = \frac{1}{\tau_0} \quad (3.7)$$

On peut vérifier alors que cette distribution $H(k)$ est la transformée de Laplace de la fonction de Becquerel. De même, on peut définir une distribution $f(\tau)$ de constantes de temps τ

($\tau=1/k$) avec cette fois une constante de temps moyenne $\langle\tau\rangle$ égale à :

$$\langle\tau\rangle = \int_0^\infty \tau f(\tau) d\tau \quad (3.8)$$

$$= \int_0^\infty I(t) dt \quad (3.9)$$

$$= \frac{\tau_0}{\beta} \quad (3.10)$$

Une différence importante est à souligner lorsque l'on traite non plus le cas précédent à savoir les courbes de déclin de luminescence du niveau excité des fluorophores mais le cas du photoblanchiment. Dans le premier cas, l'intégrale de l'intensité est nécessairement une quantité finie : ceci impose que β soit positif. Dans le cas du photoblanchiment, cette intégrale n'est pas nécessairement finie dans la mesure où le système physique, les NPs, continuent de recevoir de l'énergie par le laser. Ceci implique que les limitations sur la valeur de β doivent être levées.^[52;53] Ceci implique aussi que $\langle\tau\rangle$ peut ne pas exister (Cf. eq. 3.10).

Regardons à présent, l'ajustement de la courbe expérimentale (Fig. 3.5) par la fonction de Becquerel (équation 3.3). On observe que l'accord est très bon et que les résidus moyennés

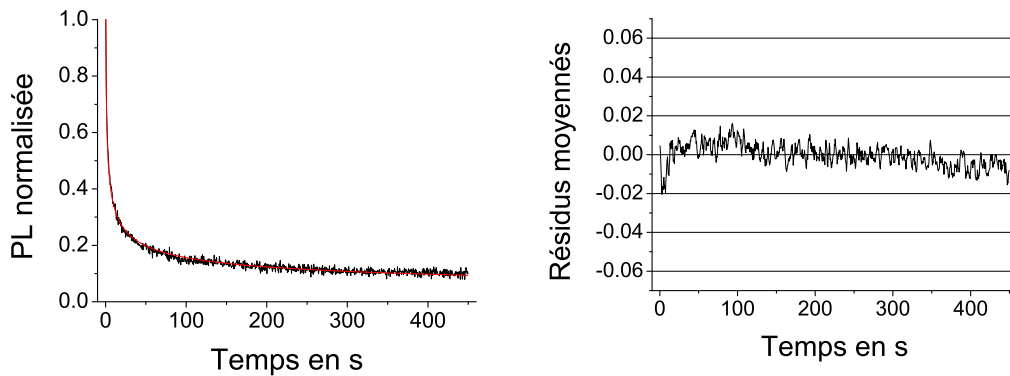


FIG. 3.9 – A gauche : PL en fonction du temps (en noir) et ajustement de type Becquerel (en rouge) avec $N_0=1.4$, $\beta=-1.9$ et $\tau_0=2$ s. A droite : résidus moyennés en fonction du temps. $I_{inc}=15 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp}=500$ ms, NPs dopées à 10%, $Q=10\%$.

sont presque aussi faibles que ceux obtenus pour un ajustement quadri-exponentiel (Fig. 3.7).

Pour un ensemble de 37 NPs individuelles dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment (Fig. 3.5), on trouve : $\beta=-1.97\pm0.62$ et $\tau_0=0.81\pm0.51$ s.

Comme nous l'avons mentionné, nous trouvons une valeur de β négative qui correspond à la quasi-stationnarité du signal observé sur les temps longs. Notons de plus que cette fonction

permet à l'aide de seulement 2 paramètres de décrire entièrement la dynamique complexe de photoblanchiment. Le paramètre N_0 est un paramètre de normalisation tenant compte simplement du fait que la première valeur de nos données correspond à l'intégration du signal pendant le temps d'acquisition et non à la valeur pour $t=0$.

Dans la partie modélisation de ce chapitre, une autre fonction sera proposée. Il est cependant utile d'avoir une fonction simple qui, indépendamment d'un modèle, permet de décrire cette dynamique afin de pouvoir comparer cette dynamique à d'autres. Nous n'avons cependant pas trouvé dans la littérature de valeur de β proche de celle déterminée ici.

Résultat 1 : La courbe de photoblanchiment des NPs est une fonction multi-exponentielle et présente des constantes de temps de photoblanchiment s'étendant sur trois ordres de grandeur. La fonction de Becquerel peut être ajustée correctement à ces courbes.

Irréversibilité spontanée vs réversibilité induite

La présence d'un état quasi-stationnaire observé sur les temps longs ou du moins celle d'un ralentissement considérable de la dynamique du photoblanchiment nous engage à étudier la réversibilité de ce phénomène.

La première expérience porte sur l'arrêt de l'illumination laser pendant 20 min suivi d'une reprise de l'illumination à même intensité et longueur d'onde. Un photoblanchiment de 5 min a été réalisé au préalable. Les deux exemples de la Fig. 3.10 sont à l'image de ce que

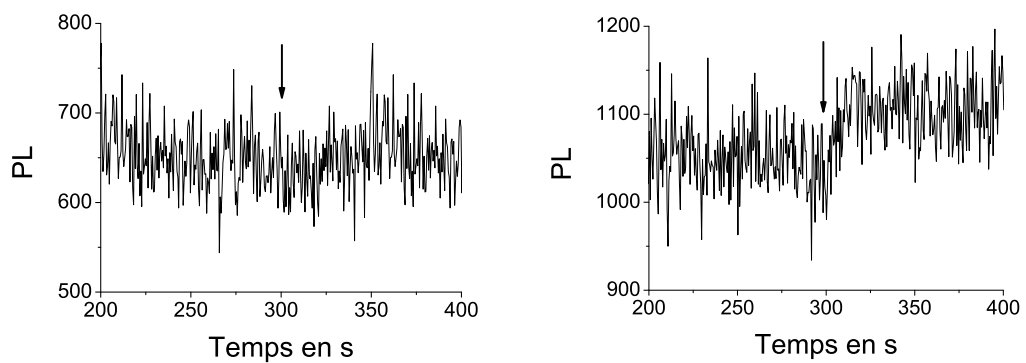


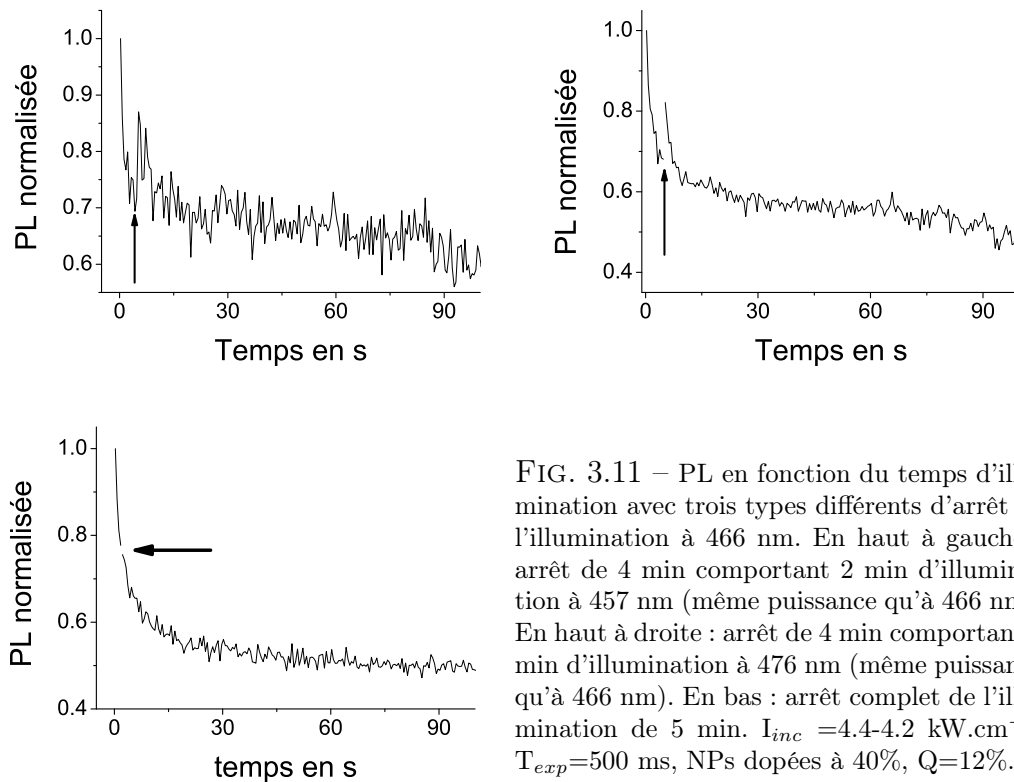
FIG. 3.10 – Deux exemples de PL d'une NP individuelle en fonction du temps d'illumination. Illumination à 466 nm pendant 5 min ($I_{inc} = 4.4\text{-}4.2 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$), arrêt de l'illumination pendant 20 min (flèche noire), reprise de l'illumination à 466 nm. Le temps en abscisse représente le temps d'illumination. NPs dopées à 40%, $Q=12\%$.

nous observons sur l'ensemble des NPs étudiés : majoritairement, nous ne voyons aucune

augmentation de la photoluminescence après l'arrêt de l'illumination. Dans certains cas (figure de droite), nous observons toutefois une légère augmentation. En moyenne ($N=40$), nous observons une augmentation de $3\% \pm 5\%$.

Nous pouvons conclure que, d'une part le phénomène de photoblanchiment n'est pas réversible pour ces échelles de temps, et, d'autre part que l'état quasi-stationnaire observé sur les temps longs ne peut pas résulter d'un équilibre entre le photoblanchiment et un recouvrement spontané.

Sur la Fig. 3.11, nous montrons l'effet d'une illumination supplémentaire à 457 nm (en haut à gauche) et 476 nm (en haut à droite) pendant un arrêt de l'illumination à 466 nm (en bas, contrôle avec arrêt complet de l'illumination). Nous précisons qu'à ces longueurs d'onde, les ions Europium n'absorbent pas. En moyenne ($N_{457nm} = 25$ NPs, $N_{476nm} = 29$ NPs), on



observe, dans les deux cas, un recouvrement de $17\% \pm 10\%$ après l'arrêt de l'illumination.

Ces courbes montrent tout d'abord que nous n'observons pas de diminution de la PL après l'illumination à 457 nm ou 476 nm. Ceci est une première indication sur la nécessité d'exciter les ions Europium pour provoquer le photoblanchiment. Ces courbes démontrent que le fait

d'illuminer les NPs à deux longueurs d'onde non résonantes avec les niveaux d'énergie de l'Europium et encadrant celle résonante (466 nm) provoque un recouvrement de la PL. Le fait d'observer le même recouvrement pour ces deux longueurs d'onde indique que très certainement ce recouvrement est présent en parallèle du photoblanchiment pour l'excitation à 466 nm. Enfin, la valeur de 17% pour ce recouvrement indique que la dynamique de recouvrement est bien plus faible que celle de photoblanchiment. En effet, une illumination de 2 min à ces longueurs d'onde provoque (en terme d'amplitude) un recouvrement plus faible que le photoblanchiment observé pendant la même durée d'illumination. En revanche, ce mécanisme, s'il contrebalance celui de photoblanchiment, pourrait expliquer la quasi-stationnarité aux temps longs. Nous reviendrons sur ce point dans la suite.

Résultat 2 : Une excitation de l'Europium est nécessaire à l'observation du photoblanchiment. La dynamique du photoblanchiment des NPs ne résulte pas d'un équilibre avec un mécanisme de recouvrement spontané. En revanche, l'excitation des NPs avec deux longueurs d'onde encadrant celle d'excitation résonante des ions Europium provoque un recouvrement mesuré de la luminescence.

Photoblanchiment photo-induit et saturable

Nous nous intéressons à présent à l'effet de l'intensité incidente sur la dynamique du photoblanchiment.

La figure suivante de gauche (Fig. 3.12) représente cet effet pour des intensités allant de 2.5 kW.cm^{-2} à 15 kW.cm^{-2} : plus l'intensité est forte plus le photoblanchiment est important.

Afin de donner une représentation plus classique de cet effet, des courbes de photoblanchiment (d'une autre synthèse de NPs) ont été analysées par les temps de photoblanchiment obtenus par des ajustements exponentiels. En effet, pour un système à trois niveaux (Cf. chap. 2), la PL décroît selon une exponentielle dont la constante de photoblanchiment τ_{pb} est directement reliée à l'intensité incidente par :

$$\tau_{pb} = \tau_{pb}^{\infty} \left(1 + \frac{I_s}{I}\right) \quad (3.11)$$

où I_s est l'intensité de saturation et τ_{pb}^{∞} la valeur de τ_{pb} pour $I \gg I_s$. Le respect ou non de cette dépendance de τ_{pb} avec I permet de manière synthétique de savoir si le photoblanchiment

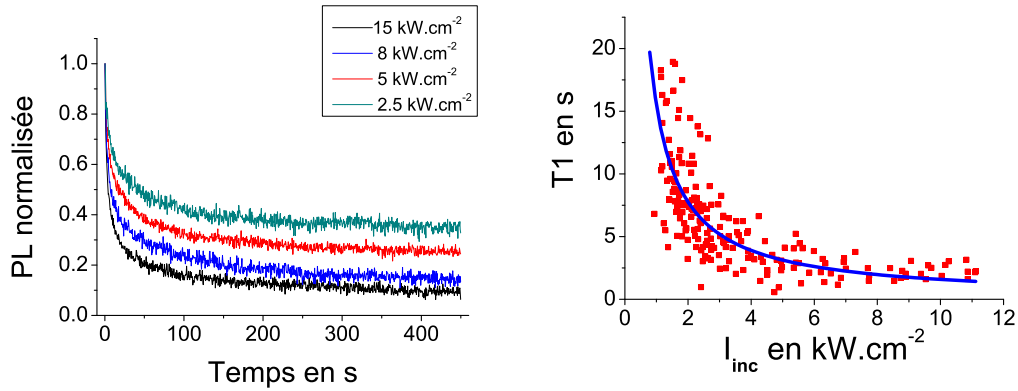


FIG. 3.12 – Effet de l'intensité incidente sur le photoblanchiment. A gauche : Pl en fonction du temps $I_{inc} = 2.5-15 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$, NPs dopées à 10%, $Q = 12\%$. A droite : temps de photoblanchiment court obtenu par un ajustement bi-exponentiel sur un temps total d'observation de 100 s ; chaque point rouge représente une NP individuelle et en bleu est indiqué le fit en $1/I$ défini dans le texte ($\tau_{pb}^{\infty} = 0.0015 \pm 0.0013 \text{ s}$, $I_s = 1042 \pm 669 \text{ kW.cm}^{-2}$, $I_{inc} = 1-11 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$, NPs dopées à 20%, $Q = 9\%$).

passé par l'état excité de la molécule d'intérêt. Les courbes de photoblanchiment ont été ajustées avec des fonctions bi-exponentielles en réduisant le temps total d'observation afin d'avoir des ajustements corrects. Ceci revient à considérer uniquement les premiers temps de la dynamique. Sur la Fig. 3.12 de droite, sont indiqués les résultats pour le τ_{pb} le plus court (T_1) ainsi que l'ajustement par l'équation précédente. L'accord avec l'ajustement est relativement bon. Des résultats similaires pour le second temps ont été obtenus ainsi que pour d'autres synthèses de NPs. Ces résultats, associés au résultat 2, montrent que le photoblanchiment est relié à l'état excité des ions Europium.

En outre, afin de voir si le photoblanchiment sature pour les fortes intensités, nous avons choisi d'étudier le ratio de photoblanchiment après 100 et 450 secondes ($\text{ratio}(100 \text{ s}) = 1 - \langle N(100 \text{ s}) \rangle / N(0.25 \text{ s})$, $\text{ratio}(450 \text{ s}) = 1 - \langle N(450 \text{ s}) \rangle / N(0.25 \text{ s})$) en fonction de l'intensité incidente, $N(0.25 \text{ s})$ correspondant au nombre de photons détectés sur la première image pour un temps d'exposition de 500 ms et " $\langle \rangle$ " définissant une moyenne sur 20 images. On voit clairement sur la Fig. 3.13 que l'amplitude du photoblanchiment sature après 10 kW.cm^{-2} et vaut 0.9 après 450 s. Nous avons observé aussi qu'en illuminant encore plus longtemps les NPs le signal normalisé tendait vers une asymptote proche de 0.1.

Résultat 3 : Le photoblanchiment des NPs est un phénomène photo-induit i.e. qui transite par l'état excité des ions Europium. L'amplitude de ce photoblanchiment sature vers une valeur de 90% pour les très fortes intensités.

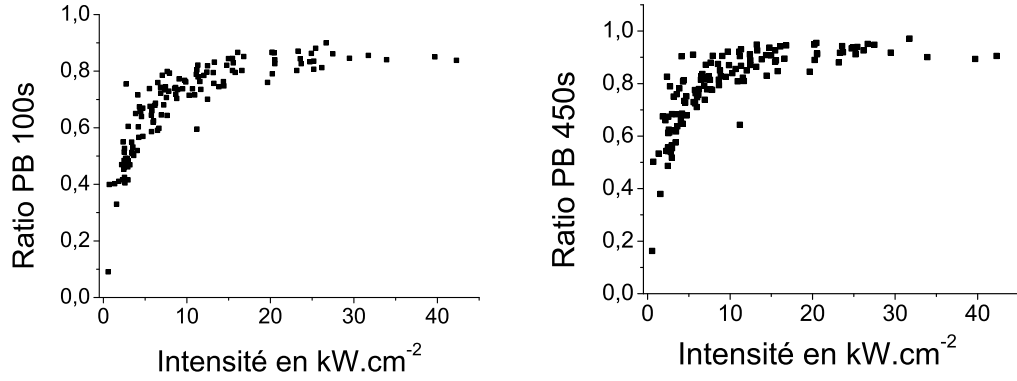


FIG. 3.13 – Effet de l'intensité incidente sur le ratio de photoblanchiment après 100 s (gauche) et 450 s (droite). NPs dopées à 10%, $T_{exp}=500$ ms.

Dépendance du photoblanchiment en fonction de la taille des NPs

Nous voulons connaître la dépendance de la dynamique du photoblanchiment en fonction de la taille des NPs.

Deux cas extrêmes sont montrés dans la figure suivante : à gauche une NP de 15 nm à droite une de 30 nm. Le photoblanchiment est clairement plus important pour le cas des

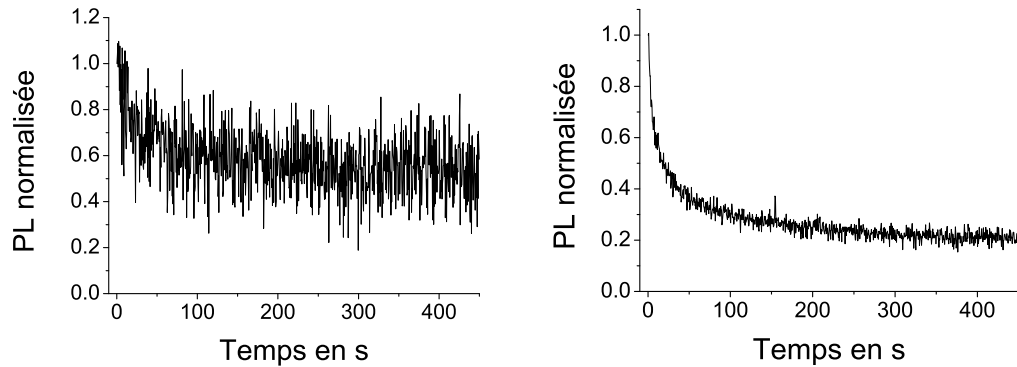


FIG. 3.14 – Effet de la taille sur les courbes de photoblanchiment. A gauche : NP de 15 nm, taille calculée selon la méthode du chap.1. A droite : NP de 30nm. $I_{inc}=4-4.4$ kW.cm $^{-2}$, $T_{exp}=500$ ms, NPs dopées à 40%, $Q=12\%$.

NPs de taille plus importante. Pour quantifier cette dépendance, le paramètre le plus neutre possible en termes de modèle a été choisi : nous choisissons là aussi de mesurer pour chaque NP le ratio du photoblanchiment à $t=300$ s. Les figures suivantes montrent une dépendance biphasique. Après approximativement 20 nm, le photoblanchiment ne dépend plus de la taille. Avant 20 nm, en revanche, l'amplitude du photoblanchiment croît.

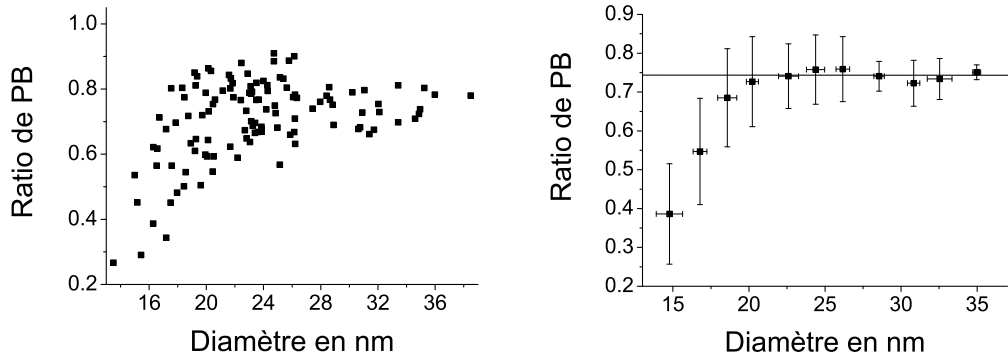


FIG. 3.15 — Effet de la taille sur le photoblanchiment. A gauche : ratio de décroissance $(1 - \frac{N(300s)}{N(0.25s)})$ en fonction du diamètre. A droite : ratio moyenné par tranche de taille de 2 nm. $I_{inc} = 4\text{-}4.4 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$, NPs dopées à 40%, $Q=12\%$.

Pour expliquer cette dépendance, prenons tout d'abord le cas d'un photoblanchiment lié à la présence d'espèces en surface qui, une fois les ions Europium proches de la surface dans un état excité, viendrait transformer cet état en un autre état non-fluorescent. Dans cette hypothèse, le photoblanchiment devrait être plus fort à mesure que la taille des NPs diminue. Au vu des résultats, nous pouvons écarter cette possibilité. Nous avons vu de plus que le photoblanchiment concernait un nombre important d'ions Europium comme le montre bien par exemple les ratios de photoblanchiment obtenus précédemment ou ceux obtenus pour des intensités plus fortes. Ceci implique que les ions Europium qui photoblanchissent sont distribués à l'intérieur d'une bonne partie de la NP, i.e. à la fois dans le coeur et à la surface de la NP. Un premier mécanisme qui sera confirmé par la suite permet alors d'expliquer l'effet de diminution du photoblanchiment pour les petites tailles. Le photoblanchiment toucherait la majorité des ions Europium dans la structure à l'exclusion complète ou partielle de ceux de surface. Ainsi, plus la taille des NPs est importante plus le nombre d'ions Europium proches de la surface représentera une fraction minime du nombre total d'Europium.

Comme nous pouvons le voir sur la Fig. 3.15 (gauche), les données sont bruitées. Ainsi, dans le reste de cette étude nous ne considérerons pas des tailles de NPs aussi faibles ce qui conduit à affirmer que, pour les tailles relativement importantes, le photoblanchiment ne dépend pas de la taille.

Résultat 4 : Pour les tailles (observables) de NPs comprises entre 15 et 20 nm, le photoblanchiment croît à mesure que la taille croît. Pour des tailles supérieures à 20 nm, l'amplitude du photoblanchiment ne varie plus et ce jusqu'à 30-35 nm (limite supérieure de la distribution

en taille étudiée).

Effet négatif de la température sur l'amplitude du photoblanchiment

Nous avons estimé l'influence de la température sur le photoblanchiment des NPs en utilisant des solutions de tampon phosphate à 4, 21 et 45°. Un exemple de PL d'une NP individuelle pour chaque condition est montré dans la figure suivante. On voit clairement que

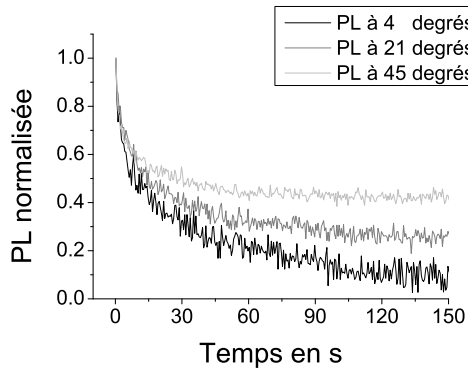


FIG. 3.16 — Effet de la température sur le photoblanchiment. $I_{inc} = 4.4 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$, NPs dopées à 40%, $Q = 12\%$, tampon phosphate à $\text{pH} = 7.4$.

plus la température baisse et plus l'amplitude du photoblanchiment est forte. En moyenne ($N_{4^\circ\text{C}} = 24$ NPs, $N_{21^\circ\text{C}} = 43$ NPs, $N_{45^\circ\text{C}} = 38$ NPs), nous obtenons pour le ratio de photoblanchiment r défini comme précédemment : $r_{4^\circ\text{C}} = 0.90 \pm 0.06$, $r_{21^\circ\text{C}} = 0.69 \pm 0.10$ et $r_{45^\circ\text{C}} = 0.59 \pm 0.17$.

Résultat 5 : L'amplitude du photoblanchiment croît à mesure que la température du milieu dans lequel les NPs se trouvent décroît.

Nous venons de caractériser les propriétés générales du photoblanchiment de ces NPs. Ces propriétés se retrouvent sur de nombreuses synthèses que nous avons pu utiliser. Deux autres propriétés sont à relever pour finir.

La première correspond au fait que nous n'avons pas observé d'effet sur la dynamique du photoblanchiment lorsque l'on change la polarisation du laser. De plus, nous avons observé le même type de photoblanchiment en excitant les NPs dans l'UV à 337nm. Dans ce cas, l'absorption se fait par les vanadates puis transfert d'énergie résonnant vers les ions Europium. Cependant, du fait d'imprécisions sur la mesure de l'intensité dans l'UV, nous n'avons pas pu comparer précisément l'amplitude du photoblanchiment en excitant à 337 nm par rapport à 466 nm, apparemment le photoblanchiment est au moins aussi important.

Nous détaillons dans la partie suivante le mécanisme de photo-réduction se déroulant lors du photoblanchiment.

3.2.2 Photo-réduction des nanoparticules

Nous allons démontrer dans cette partie que le photoblanchiment est en fait une photo-réduction des ions Europium *i.e.* une transformation des ions Europium trivalents (Eu^{3+}) en ions divalents (Eu^{2+}). Nous rappelons que le nombre normal d'oxydation de l'Europium dans la structure orthovanadate est de 3. A partir de spectres d'excitation et d'émission, nous montrerons que le laser induit cette photo-réduction. Nous conforterons ce résultat en observant la photoluminescence des NPs soumises à des conditions oxydantes et réductrices. Le but de cette partie est de comprendre le mécanisme de photoblanchiment et sa dynamique, nous réserverons l'étude de certaines données complémentaires sur l'oxydation pour la partie portant sur les applications de ce phénomène (Cf. chap.6).

Spectre d'excitation et d'émission avant et après photoblanchiment

Nous avons remarqué avant de faire l'expérience spectrale qu'après photoblanchiment la PL pouvait être récupérée par l'ajout d'une solution oxydante. L'expérience suivante a été alors proposée afin de quantifier l'effet du photoblanchiment sur les spectres d'excitation et d'émission des Europium et notamment l'apparition éventuelle du spectre caractéristique de l' Eu^{2+} .

Afin de réaliser cette expérience, nous déposons sur une lamelle en silice une concentration en NPs 500 fois supérieure à celle nécessaire pour l'observation de NPs individuelles afin d'avoir un signal suffisant en spectrofluorimétrie. Nous délimitons une zone de $\approx 4\text{mm}^2$ à l'aide d'un masque. Cette zone est ensuite photoblanchie par passage successif sur chaque sous-zone à l'aide de notre montage de microscopie. Les spectres avant et après photoblanchiment sont alors enregistrés à l'aide du spectrofluorimètre Hitachi déjà présenté en sélectionnant les bandes d'émission et d'excitation de l' Eu^{2+} .

Avant photoblanchiment, nous n'observons pas de trace des spectres caractéristiques d'excitation et d'émission de l' Eu^{2+} (Fig. 3.17, courbe noire et bleu). Notons que la remontée de la courbe noire vers l'UV lointain est un artefact lié au spectrofluorimètre.

En revanche, après photoblanchiment, nous voyons l'apparition du spectre caractéris-

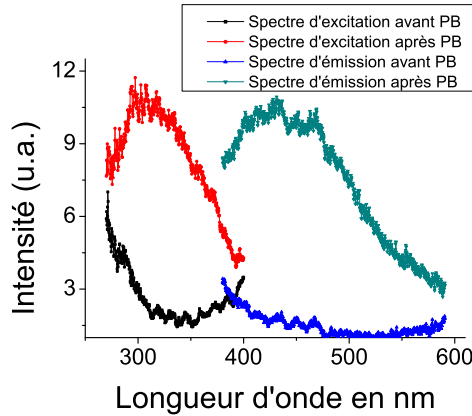


FIG. 3.17 – Effet du photoblanchiment sur les spectres d'excitation (émission : 425 nm) et d'émission (excitation : 350 nm). NPs (dopage 20%, $Q=13\%$) déposées sur lamelle de silice à forte concentration, photoblanchiment d'une région de la lamelle de $\approx 4\text{mm}^2$ pendant 1 heure, spectres mesurés sur un spectrofluorimètre Hitachi F-4500.

tique^[54] de l' Eu^{2+} avec un maximum d'absorption vers 320 nm et un maximum d'émission vers 425 nm. Le photoblanchiment serait donc lié à la transformation de l' Eu^{3+} en Eu^{2+} : il s'agirait donc d'une réduction induite par laser. Suzuki *et al* ont observé une réduction similaire après illumination UV dans des verres dopées avec des complexes à base d'ions Europium.^[54] Nous reviendrons sur cet article dans la partie interprétation (3.2.5).

Résultat 6 : Le photoblanchiment des ions Europium induit l'apparition de l'espèce Eu^{2+} , forme réduite de l'ion Europium de départ.

Recouvrement complet de la PL induit par une forte concentration en H_2O_2

Pour confirmer ce dernier résultat, des mesures de recouvrement de la PL, induit par une solution oxydante, ont été menées. Nous définissons par le terme de recouvrement l'augmentation du nombre de photons détectés suivant une période de photoblanchiment.

La figure suivante montre la PL d'une NP individuelle avant et après l'injection dans le support de lamelle d'une solution de peroxyde d'hydrogène ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{support}} = 10 \text{ mM}$) Ce peroxyde est un oxydant fort, bien connu, et possède un potentiel redox à pH 7.4 de 1.36 V. Nous observons un recouvrement complet de la PL. Notons que la saturation observée aux temps longs correspond à une valeur de PL légèrement supérieure à celle de départ : ceci est dû au fait que la première valeur de PL résulte de l'intégration du nombre de photons détectés pendant le temps d'acquisition et ne correspond donc pas à la véritable valeur à $t=0$. Pour des concentrations de H_2O_2 encore supérieures, nous n'avons jamais observé une valeur de saturation supérieure à celle à $t=0$.

Ceci corrobore tout d'abord l'hypothèse que le photoblanchiment est une photo-réduction

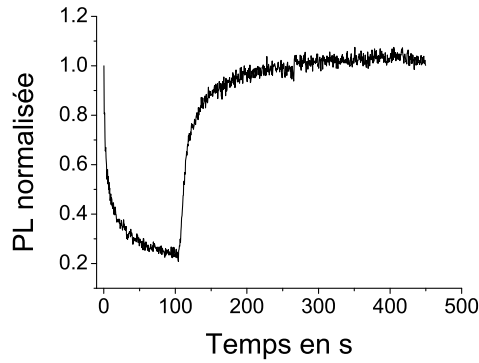


FIG. 3.18 – Effet de l'ajout d'une solution de H_2O_2 sur la PL d'une NP individuelle. Injection à $t=100\text{s}$ d'une solution de H_2O_2 , $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{support}} = 10\text{ mM}$ à une solution initiale de TP ($\text{pH}=7.4$, 50mM). $I_{\text{inc}} = 4.4\text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{\text{exp}} = 500\text{ms}$. NPs : dopage 40%, avec BS^3 hydrolysé en surface.

(Résultat 6). En effet, le peroxyde d'hydrogène pourrait par son pouvoir oxydant retransformer les Eu^{2+} en Eu^{3+} . C'est ce que, manifestement, nous observons dans cette expérience.

Cependant, des études faites sur l'Europium tétracycline, un complexe de lanthanides disponible commercialement et servant de senseur à H_2O_2 , ont montré que la sensibilité de ce senseur était liée au remplacement, dans l'environnement proche de l'ion Europium, d'un hydroxyle, "quencher" connu de l'émission des ions Europium (Cf chap.6), par une molécule de H_2O_2 .^[55] Dans ce cas, le peroxyde d'hydrogène n'agit pas sur l'émission des ions Europium par son pouvoir oxydant mais par une amélioration du rendement quantique.

Pour prouver qu'il s'agit bien dans notre cas d'un effet d'oxydation, l'expérience suivante a été conduite. Simplement, le spectre d'émission des ions Europium a été mesuré en présence ou en l'absence de H_2O_2 . Nous n'observons aucune modification tant sur le plan de

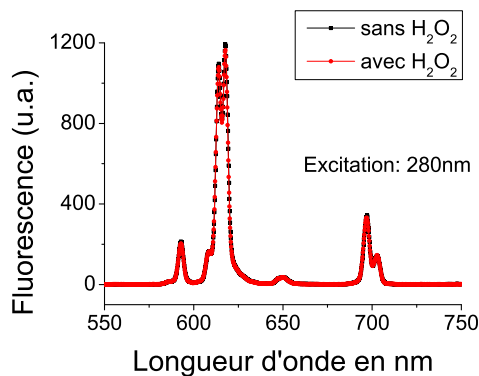


FIG. 3.19 – Effet de l'ajout d'une solution de H_2O_2 (10 mM) sur le spectre d'émission des ions Europium (excitation à 280 nm). Un temps de 30 min a été laissé entre l'injection de la solution de H_2O_2 dans la cuve de NPs et la mesure. NPs : dopage 40%, avec BS^3 hydrolysé en surface.

l'amplitude que sur celui de la forme du spectre. Nous pouvons donc rejeter l'hypothèse selon laquelle l'effet de H_2O_2 est lié à une amélioration du rendement quantique. Inversement, ces résultats confirment que le photoblanchiment est bien lié à une photo-réduction et qu'il est

possible d'oxyder chimiquement les Eu^{2+} ainsi formés. Nous apporterons une confirmation supplémentaire en utilisant un réducteur.

Par ailleurs, nous voyons sur la Fig. 3.18 que le recouvrement est total. De plus, nous n'avons jamais observé de recouvrement sans avoir pré-photoblanchi les NPs. Ces deux dernières observations impliquent que le photoblanchiment est uniquement dû à la photo-réduction des ions Europium.

Enfin, dans la mesure où

- une grande partie des ions Europium sont concernés par la photo-réduction, *i.e.* même ceux localisés au coeur de la NP,
- le recouvrement est complet,
- le peroxyde d'hydrogène agit initialement en surface,

nous pouvons affirmer qu'il existe un mécanisme qui permet au pouvoir oxydant du peroxyde d'hydrogène de se faire ressentir jusqu'au coeur de la NP. En d'autres termes, les ions Europium divalents même s'ils ne sont pas en contact direct avec le H_2O_2 , peuvent être oxydés. Il semble probable, pour l'instant, qu'un mécanisme de diffusion des électrons de la surface vers le coeur se met en place lorsque le H_2O_2 est rajouté en solution.

Résultat 7 : L'ajout d'une forte concentration de peroxyde d'hydrogène entraîne un recouvrement complet de la luminescence des NPs pré-photoblanchies. Le peroxyde d'hydrogène, agissant dans notre cas comme un oxydant, induit la transformation des Eu^{2+} en Eu^{3+} . Le photoblanchiment est entièrement dû à une photo-réduction des ions Europium trivalents. Enfin, il existe un mécanisme de diffusion de l'effet oxydant du H_2O_2 vers l'intérieur de la NP.

Réduction des Europium induite par l'Hydrazine

Nous avons souhaité savoir si un agent réducteur fort tel que l'hydrazine peut entraîner une réduction des ions Europium se manifestant par une baisse de la PL.

On observe nettement sur la Fig. 3.20 que l'ajout de l'hydrazine entraîne une baisse de la PL. En moyenne ($N=60$ NPs), nous avons une chute de la PL de $55\% \pm 8\%$. L'effet est cependant beaucoup moins fort que celui de H_2O_2 pour des concentrations similaires. Cette expérience est une première indication sur le fait que les ions Europium peuvent aussi être réduits par voie chimique.

Résultat 8 : L'ajout d'une forte concentration d'hydrazine entraîne une diminution de la

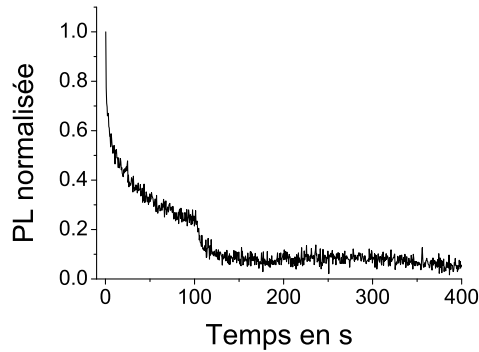


FIG. 3.20 – Réduction des ions Europium induite par ajout d'hydrazine (12 mM à la 100^{ième}s) observée par la baisse de la PL d'une NP individuelle. NPs : dopage 40%, avec BS^3 hydrolysé en surface. $I_{\text{inc}} = 4.6-6.3 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{\text{exp}} = 500 \text{ ms}$.

luminescence des NPs pré-photoblanchies.

Réversibilité de la photo-réduction, de la réduction par l'hydrazine et de l'oxydation par H_2O_2

Des cycles de photoblanchiment, oxydation par H_2O_2 , rinçage par du tampon phosphate (TP) ont été menés. A part pour le deuxième et le quatrième cycle, nous ajoutons la même concentration de H_2O_2 .

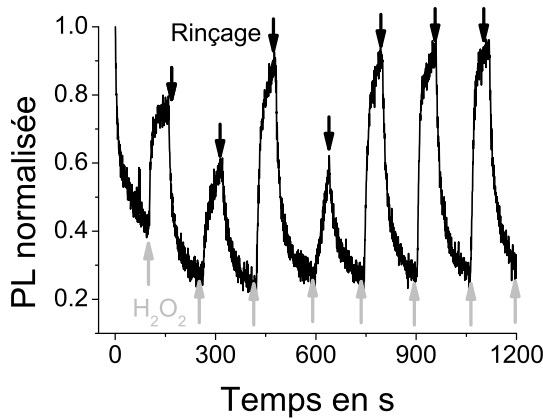


FIG. 3.21 – Réversibilité de l'effet de l'ajout de H_2O_2 sur la PL observée en effectuant des cycles d'addition de H_2O_2 (10mM, à part pic 2 et 4 : 5mM) dans le support et rinçage du support avec du TP. NPs : dopage 40%, avec BS^3 hydrolysé en surface. $I_{\text{inc}} = 4.4-6.0 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{\text{exp}} = 500 \text{ ms}$. Le temps en abscisse correspond au temps d'illumination de telle manière à ne pas tenir compte du temps de rinçage par le TP (arrêt de l'illumination pendant 30 s).

On observe sur la Fig. 3.21 que la PL suit de manière reproductible ces cycles. Après le retrait de la solution de H_2O_2 , l'évolution de la PL retrouve le caractère fortement décroissant initial.

De même, des cycles de photo-réduction, oxydation par H_2O_2 et réduction par l'hydrazine ont été menés. Sur la Fig. 3.22, la réversibilité de ces modifications apparaît clairement. Le fait que l'effet de l'hydrazine puisse être annulé par ajout de H_2O_2 constitue une bonne preuve que

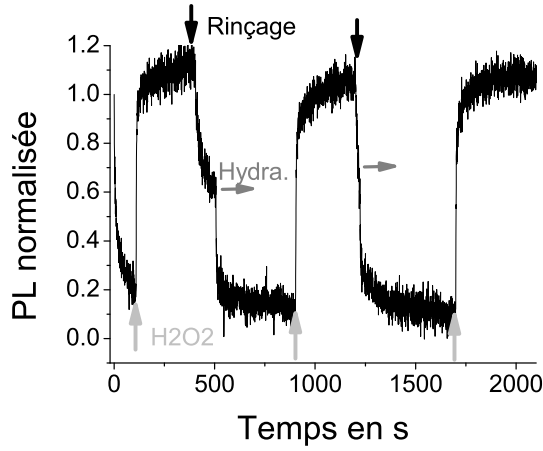


FIG. 3.22 – Réversibilité de l'effet de l'ajout de l'hydrazine sur la PL démontrée par des cycles de photoblanchiment, d'addition d'hydrazine (145 mM), rinçage avec TP, d'addition de H₂O₂ (2.7 mM), rinçage du support avec du TP. NPs : dopage 40%, avec BS³ hydrolysé en surface. $I_{inc} = 4.4-6.3 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$. Le temps en abscisse correspond au temps d'illumination.

l'hydrazine joue bien ici le rôle de réducteur des ions Europium et donc que ces ions peuvent aussi être réduits par voie chimique.

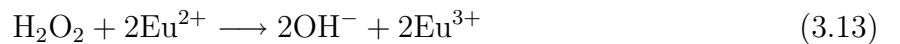
Résultat 9 : La réversibilité observée sur les courbes de PL de NPs soumises successivement à des conditions oxydantes et réductrices confirme de manière définitive que les ions Europium peuvent être réduits et oxydés par voie chimique et que le photoblanchiment est entièrement dû à une réduction photo-induite.

L'ensemble de ces expériences concorde pour affirmer que le photoblanchiment est entièrement dû à une photo-réduction des ions Europium trivalents. Nous avons de plus montré que les ions Europium divalents pouvaient être transformés en ions trivalents par ajout de H₂O₂. Inversement, les ions trivalents peuvent être réduits par l'hydrazine.

Il existe donc à l'intérieur de la NP (résultat 4) une espèce A, pour l'instant inconnue, capable de réduire les ions Europium. On peut donc écrire globalement :



En condition légèrement basique, l'effet de H₂O₂ sur les ions Europium s'écrira :



Une étude plus complète de l'effet de H₂O₂ sera proposé dans le chapitre 6. La prochaine section est consacrée aux liens existant entre la position des ions Europium dans la structure cristalline et leur photo-réduction plus ou moins rapide.

3.2.3 Correspondance position-dynamique de photo-réduction

Cette partie sera consacrée tout d'abord à l'étude des déclins de fluorescence (DFs). De ces déclins, nous déduirons que la photo-réduction (PR) conduit à une diminution du temps de vie moyen des NPs. A partir d'expériences portant sur l'effet de H_2O_2 , nous montrerons que la dynamique de la PR peut être scindée en deux parties : l'une correspondant aux ions Europium situés au coeur de la NP présentant une PR rapide et l'autre à ceux de surface avec une PR plus lente.

Effet de la photo-réduction sur les déclins de fluorescence

Les DFs ont été mesurés à l'aide d'une excitation laser à 337 nm, d'un chopper mécanique permettant de couper cette excitation et d'un photomultiplicateur relié à un oscilloscope numérique. Quatre DFs ont été enregistrés dans les conditions suivantes :

- DF initial *i.e.* avant PR
- DF après une photoréduction de 10 min des NPs dans la cuve,
- DF après une PR supplémentaire de 10 min,
- DF après l'ajout d'une solution de H_2O_2 (0.4 mM) dans la cuve comportant les NPs photo-réduites.

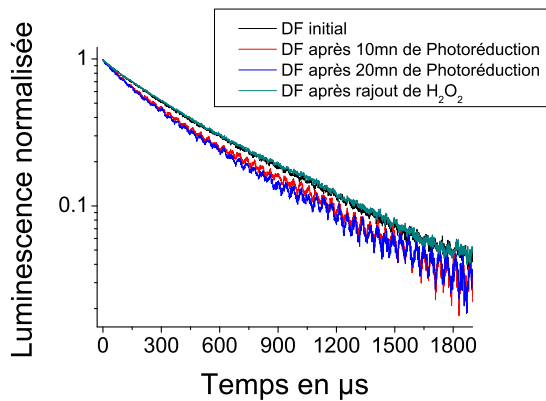


FIG. 3.23 – Effet de la PR, puis de l'ajout de H_2O_2 sur les déclins de fluorescence. Le DF initial et après rajout H_2O_2 sont pratiquement superposés. NPs : dopage 10%, excitation 337 nm, $P_{laser} = 28$ mW

Sur ces courbes, des ajustements bi-exponentiels ont été réalisés. Nous résumons les paramètres des ajustements obtenus dans le tableau suivant.

Le DF avant réduction comporte deux temps caractéristiques. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la présence de deux temps est attribuée au "quenching" par des hydroxyles de surface qui diminue notablement le temps de vie des ions Europium de surface.

| | A_{total} (mV) | A_1/A_{total} | T_1 | A_2/A_{total} | T_2 |
|---------------------------------------|------------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| Avant PR | 9.54 | 0.26 ± 0.006 | 198 ± 3.9 | 0.74 ± 0.006 | 630 ± 3.7 |
| Après 10 min de PR | 5.92 | 0.29 ± 0.0055 | 145 ± 2.95 | 0.71 ± 0.0054 | 564 ± 3.4 |
| Après 20 min de PR | 5.06 | 0.33 ± 0.0077 | 164 ± 3.54 | 0.67 ± 0.0079 | 557 ± 4.5 |
| Après ajout de H_2O_2 | 9.6 | 0.27 ± 0.0066 | 212 ± 3.98 | 0.73 ± 0.0042 | 659 ± 4.11 |

FIG. 3.24 – Tableau récapitulatif des résultats des ajustements de DF par une fonction bi-exponentielle pour différentes conditions. Les A_i correspondent aux préfacteurs des fonctions exponentielles.

Nous pouvons dire de plus qu'il s'agit très certainement de deux distributions de temps de vie.

Nous voyons de plus que le signal des NPs a été divisé par un facteur de presque deux (5.06/9.54). Ceci assure que nous sommes dans des conditions où une bonne partie des ions Europium a été réduite.

Le premier résultat essentiel porte sur le temps de vie moyen du niveau excité des NPs. Ce temps noté $\langle T \rangle$ est défini par :

$$\langle T \rangle = \sum_i \frac{A_i T_i}{A_1 T_1 + A_2 T_2} T_i \quad (3.14)$$

Ce temps diminue au cours de la PR des NPs, passant de 588 μs , à 525 μs , puis à 507 μs . Après l'ajout de H_2O_2 , le temps de vie moyen (611 μs) retrouve une valeur proche de celle initiale.

Il est important d'insister sur le fait que la diminution de luminescence observée est due entièrement à une réduction des Europium *i.e.* à une transformation de l'Europium en une espèce non fluorescente à cette longueur d'onde de détection. Ceci implique que ce sont les ions Europium qui n'ont pas été transformés qui ont un temps de vie plus faible et non que les ions Europium ont globalement un temps de vie plus faible. A l'intérieur de la NP, les ions Europium de surface ayant un temps de vie plus faible, on en déduit que la PR touche prioritairement les ions Europium de coeur.

Nous voyons aussi que l'amplitude A_1 correspondant aux temps courts devient de plus en plus importante par rapport à celle des temps longs (0.26 initialement, 0.29 après 10 min, 0.33 après 20 min). Ceci semble donc confirmer l'analyse précédente.

Pour aller plus loin, un modèle simple de luminescence est employé. Deux systèmes indépendants à deux niveaux et de même constante radiative sont considérés. Le premier de temps de vie τ_c représente le coeur de la NP et une fraction α du total. Le second représente

la surface avec un temps de vie τ_s et correspond à une fraction $1-\alpha$. Le nombre de photons détectés N_{det} au cours du DF s'écrit alors simplement, en normalisant à 1 pour $t=0$, comme :

$$N_{det}(t) = \frac{1}{\alpha\tau_c + (1-\alpha)\tau_s} (\alpha\tau_c \exp^{-\frac{t}{\tau_c}} + (1-\alpha)\tau_s \exp^{-\frac{t}{\tau_s}}) \quad (3.15)$$

En ajustant les courbes de DFs avec cette équation, on déduit que la fraction, $1-\alpha$, représentant la surface augmente au cours du photoblanchiment : 0.52 initialement, 0.60 après 10 min de PR et 0.63 après 20 min de PR (0.53 après ajout de H_2O_2). Nous voyons par ce modèle élémentaire que la PR ne touche pas de la même manière les ions Europium du coeur et ceux de la surface. La PR a plutôt tendance à toucher les ions de coeur que ceux de surface, du moins initialement. Cette analyse reste cependant qualitative dans la mesure où pour véritablement comparer il aurait fallu que les temps de vie τ_c et τ_s ne changent pas. Nous avons donc voulu confirmer ces résultats par des approches complémentaires. Nous présenterons ces approches dans ce qui suit.

Résultat 10 : La PR des ions Europium entraîne une baisse significative du temps de vie moyen des NPs. Nous pouvons penser que cette baisse est liée à une réduction prioritaire et partielle des ions Europium qui possèdent les temps de vie les plus longs i.e. les ions Europium du coeur.

Effet de H_2O_2 présent initialement sur la dynamique de photo-réduction

Les figures suivantes montrent les courbes typiques de PL de NPs individuelles exposées d'emblée à plusieurs concentrations différentes de H_2O_2 . Les courbes de NPs de 20 nm et de 30 nm ont été séparées afin de faire apparaître l'effet de la taille sur la PL dans ces conditions. Analysons ces figures selon les lignes.

Sur la première ligne, nous retrouvons le résultat 4 selon lequel la PR ne dépend pas de la taille des NPs pour la gamme allant de 20 nm à 30 nm et la forme caractéristique de la PL avec une décroissance rapide ($S_{PL}(t \approx 100\text{s}) \approx 0.6$) suivie d'une décroissance plus lente ($S_{PL}(t \approx 800\text{s}) \approx 0.3$).

Sur la seconde ligne, nous observons pour les deux tailles que la décroissance rapide est toujours présente mais que la décroissance plus lente observée sur les temps longs a été remplacée par une décroissance encore plus lente. Pour les NPs de 20 nm, nous observons à partir de 50 s une valeur quasi-constante de la PL. Pour les NPs de 30 nm, la décroissance continue

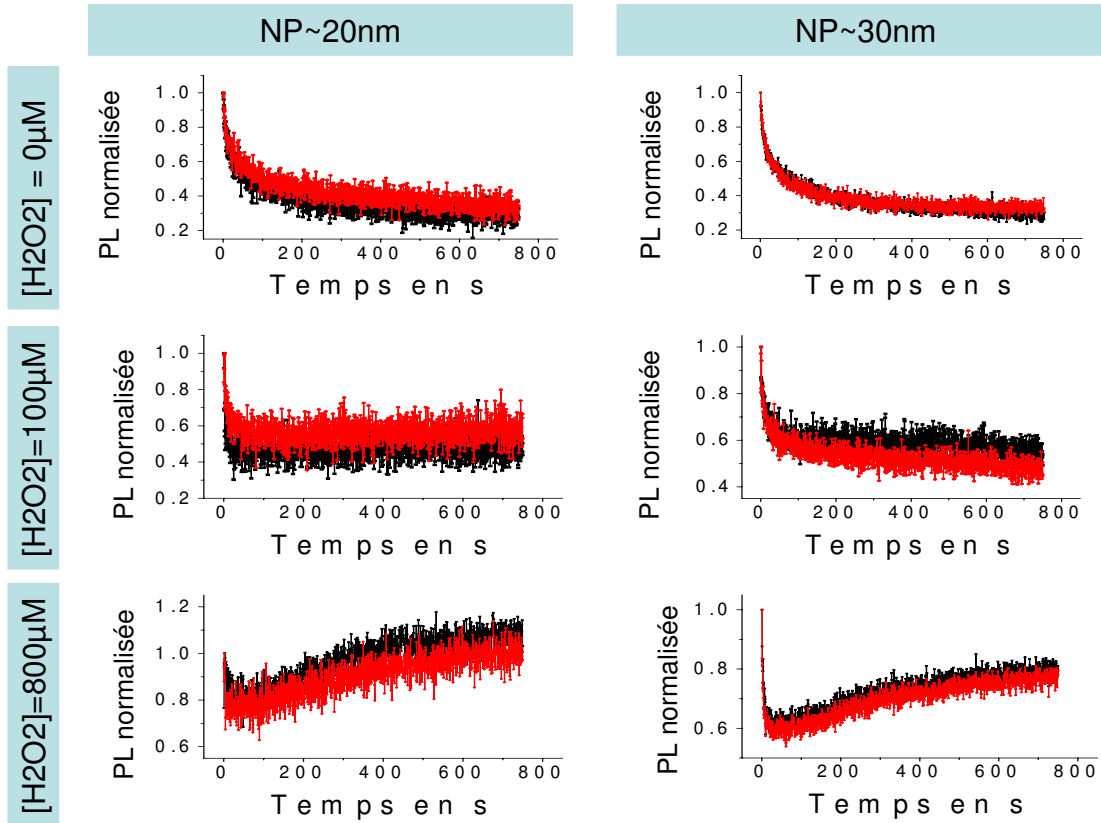


FIG. 3.25 – Effet d’une solution de H_2O_2 présente dès le début de l’illumination dans le support sur la PL pour deux tailles de NPs et trois concentrations de H_2O_2 . Pour chaque condition, deux exemples de PL de NPs individuelles sont montrés. NPs : dopage 40%, avec BS^3 hydrolysé en surface, $I_{inc} = 1.3\text{--}1.4 \text{ kW.cm}^{-2}$.

de se produire mais à un rythme clairement moins élevé que sans H_2O_2 .

La troisième ligne, enfin, correspond à la concentration en H_2O_2 la plus élevée. On observe globalement pour les deux tailles la même PL marquée par toujours cette première décroissance rapide mais suivie cette fois par un recouvrement de la PL. Dans le cas des NPs de 30 nm, la première décroissance a encore la même amplitude que sans H_2O_2 et le recouvrement de luminescence est important mais pas complet. En revanche, pour les NPs de 20 nm, la première décroissance est moins importante et le recouvrement complet.

Nous allons considérer trois cas limites afin d’interpréter ces résultats. Nous faisons de plus l’hypothèse raisonnable que le H_2O_2 agit initialement en surface et que son effet oxydant se fait ressentir graduellement de la surface vers l’intérieur de la NP (Cf. résultat 7).

Si la dynamique de PR était indépendante de la position des ions Europium dans la structure, alors l’oxydation due à H_2O_2 agirait de la même façon sur les différentes composantes de cette dynamique : on devrait donc observer globalement la même courbe mais ralentie. Ce

n'est clairement pas le cas, nous observons une dichotomie nette des effets de H_2O_2 sur les décroissances lentes et rapides.

Si la décroissance rapide était liée à la PR des ions Europium de surface, nous devrions avoir un effet de l'oxydant plus important sur cette décroissance que sur celle lente due à la PR des ions Europium du coeur de la NP. Ce n'est pas non plus ce que nous observons.

Nous comprenons donc qu'il existe nécessairement une correspondance entre la rapidité de la PR et la position des ions Europium dans le coeur de la NP. Le cas le plus édifiant est celui à 800 μM . Pour les NPs de 30 nm, la décroissance rapide est conservée car les ions Europium de coeur sont relativement bien protégés de l'effet initial de H_2O_2 en surface ce qui n'est pas le cas des NPs de 20 nm. Une fois que ces ions de coeur sont réduits, l'effet de H_2O_2 intervient : si l'oxydation l'emporte sur la PR on aura un recouvrement du signal, si l'oxydation est moins forte que la PR on aura alors une décroissance lente toujours présente mais ralentie.

Ces expériences confirment donc les expériences sur les temps de vie : la décroissance rapide de la PL est celle des ions Europium de coeur.

Résultat 11 : La PR présente deux phases de dynamique différente et associées à des ions Europium localisés à des endroits différents à l'intérieur des NPs. La décroissance initiale et rapide de la PL correspond à une PR des ions Europium appartenant au coeur de la NP. La décroissance plus lente observée sur les temps longs correspond à des ions Europium situés près de la surface.

3.2.4 Le rôle des défauts cristallins dans la photo-réduction

Nous abordons dans cette dernière partie consacrée aux résultats expérimentaux la question de la nature de l'espèce "A" qui réduit les ions Europium lors de la PR. A partir de mesures de PL obtenues sur des NPs recuites, nous verrons dans cette section que la PR est liée à la présence de défauts cristallins.

Commençons tout d'abord par considérer certaines possibilités simples sur la nature de l'espèce A. Dans la structure orthovanadate, l'électron pourrait *a priori* provenir d'un des éléments constitutifs de la NP à savoir l'ion Vanadium (V^{5+}), l'ion Yttrium (Y^{3+}) ou l'ion Oxygène (O^{2-}). Les ions Vanadium et Yttrium sont déjà sous leur forme la plus réduite : ils ne peuvent donc pas perdre un électron de plus. L'ion Oxygène en revanche peut perdre un

électron appartenant à l'un de ses doublets non-liants comme cela a été proposé par Suzuki dans le cas des verres dopés par des complexes d'ions Europium trivalents.^[54] Dans ce cas, l'oxygène appartient à un groupe silanol (Si-OH) ce qui est, cela dit, tout à fait différent de notre structure.

En fait, les expériences présentées par la suite montrent que ce sont certainement les défauts cristallins qui sont responsables de la PR.

Influence des recuits de NPs individuelles sur la photo-réduction

Des expériences effectuées au LPMC ont montré qu'un traitement thermique des NPs dopées à 10% pouvait améliorer grandement le rendement quantique des NPs par une augmentation significative de la cristallinité des NPs. Nous voulons donc savoir si le recuit des NPs induit une variation de la PR.

Brièvement, le protocole mis au point par nos collaborateurs est le suivant :

- Préparation d'un sol de TEOS (tétraméthylorthosilicate) constitué de TEOS, d'éthanol et d'eau acide chauffé à 60°C pendant 1 h, ce sol servant à créer une matrice dans laquelle le recuit va être effectué,
- Mélange du sol, des NPs et d'un agent complexant,
- Chauffage dans une étuve à 90°C pendant 18 heures,
- Recuit en deux temps : d'abord recuit à 500°C (montée en 5 h, palier de 2 h), refroidissement à température ambiante, puis recuit à 500°C (montée en 5 h, palier de 1 h) suivi d'un recuit à 1000°C (montée 5 h, palier de 10 min),
- Attaque de la poudre obtenue par l'acide fluorhydrique (HF) pendant 2 h afin d'enlever le TEOS des NPs,
- Purification et récupération des NPs recuites.

Les NPs recuites ainsi obtenues ont été caractérisées par diffraction de Rayons X, microscopie électronique, par leur spectre d'émission et d'excitation et par des mesures de DDL. Ces mesures ont montré que la cristallinité des NPs était augmentée et que la taille initiale des NPs était conservée. Notons qu'un autre protocole a été aussi utilisé et diffère notamment par l'attaque qui se fait cette fois par de la soude et les temps de montée. Nous obtenons des résultats similaires en terme d'effet sur la PR.

Nous avons alors comparé la synthèse initiale avec les deux synthèses recuites caractérisées par la température du dernier palier (800°C et 1000°C) en termes d'effet du recuit sur le ratio

de PR (comparaison entre la première valeur et la valeur à 100 s).

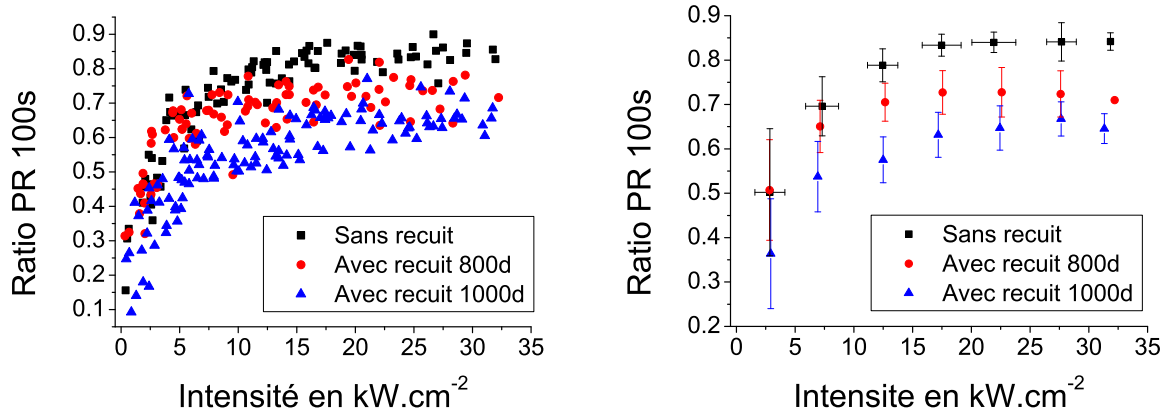


FIG. 3.26 – Effet du recuit sur la dépendance du ratio de PR après 100 s en fonction de l'intensité incidente. A gauche, ratio de PR pour chaque NP individuelle sans recuit, avec recuit à 800°C et 1000°C. A droite, moyennage du ratio de PR pour des tranches de 5 $\text{kW} \cdot \text{cm}^{-2}$. NPs dopées à 10%, $T_{\text{exp}}=500$ ms.

Plusieurs points intéressants sont à relever dans ces figures :

- on observe sur la courbe correspondant à des NPs non recuites et recuites que le ratio de PR sature à partir de 10-15 $\text{kW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Nous retrouvons le résultat 3 à ceci près que pour les NPs recuites la valeur de saturation est inférieure (sans recuit : 85%, 800°C : 75%, 1000°C : 65%).
- le recuit induit une diminution franche de l'amplitude de PR et ce quelquesoit l'intensité. Une diminution moyenne de 25% ($\pm 4\%$) de l'amplitude de PR est observée entre les NPs sans recuit et avec recuit à 1000°.

Dans la mesure où nous savons que le recuit de NPs induit une meilleure cristallinité des NPs et par là même une réduction du nombre de défauts cristallins, ces résultats expérimentaux constituent une indication que l'espèce réductrice est un défaut cristallin.

De plus, l'amplitude de la diminution du ratio de PR est certainement sous-estimée dans les expériences précédentes. En effet, dans ces expériences nous souhaitions comparer la PR à même intensité incidente. Or, ce qu'il nous importe en fait est de comparer ces PRs pour la même absorption *i.e.* pour la même probabilité ω qui est liée à l'intensité incidente mais aussi à la section efficace d'absorption (Cf. chap. 2). Il nous faut donc vérifier que cette section efficace n'a pas évolué lors du traitement thermique. Nous n'avons cependant pas encore pu mesurer cette section efficace après recuit. Nous nous contenterons alors d'estimer la probabilité de transition radiative et de supposer que si cette probabilité est modifiée il y

des chances que la section efficace d'absorption le soit aussi. Ceci se justifie par le fait que l'environnement cristalllographique des ions Europium peut influencer la force de transition des raies d'absorption et d'émission. Nous allons donc déduire la probabilité de transition radiative par des expériences sur le déclin de luminescence du niveau excité des ions Europium et sur le rendement quantique.

Des mesures de déclin de fluorescence et de rendement quantique ont été menées sur des NPs avant et après recuit à 1000°C . Nous montrons dans la figure suivante ces deux déclin.

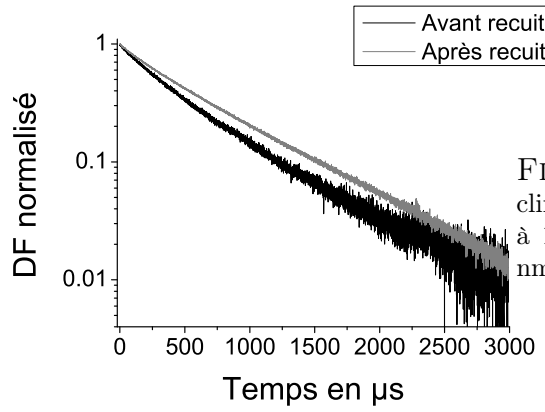


FIG. 3.27 – Effet du recuit sur les déclin de fluorescence normalisés. NPs dopées à 10%, Excitation : 337nm, Détection : 617 nm, $P_{laser}=28\text{mW}$.

Un ajustement bi-exponentiel nous donne les valeurs suivantes :

$$N_{avt\ recuit} = 0.28 \exp\left(-\frac{t}{210}\right) + 0.72 \exp\left(-\frac{t}{610}\right) \quad (3.16)$$

$$N_{apr\ recuit} = 0.21 \exp\left(-\frac{t}{225}\right) + 0.79 \exp\left(-\frac{t}{742}\right) \quad (3.17)$$

Le temps moyen du niveau excité (Cf. eq. 3.14) s'en déduit : $\langle\tau_{avt}\rangle=562\ \mu\text{s}$, $\langle\tau_{apr}\rangle=703\ \mu\text{s}$. D'autre part, les rendements quantiques ont été mesurés au LPMC et valent : $Q_{avt} = 15\%$, $Q_{apr} = 45\%$. Nous ne retrouvons donc pas l'augmentation du rendement quantique sur les temps de vie. Par la relation, $Q = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau$, nous déduisons que la probabilité de transition radiative a été fortement modifiée au cours du traitement thermique. Ceci implique que probablement la section efficace d'absorption a elle aussi été augmentée par ce traitement. Nous déduisons ainsi que l'effet du traitement thermique sur la diminution de la PR est probablement plus fort que ce que nous pouvons observer sur la Fig. 3.26. Il est difficile de quantifier cet effet mais il semble raisonnable de penser que pour une comparaison à même absorption et en supposant que l'amélioration de k_r se retrouve sur celle de la section efficace,

le cas sans recuit à 11 kW.cm^{-2} devrait être plutôt rapproché de celui avec recuit (1000°C) à 5 kW.cm^{-2} ce qui correspond à une division par deux de la PR.

Résultat 12 : L'amplitude de PR montre une saturation en fonction de l'intensité incidente dont la valeur est réduite lorsque la température de recuit augmente. Les recuits provoquent une diminution importante de l'amplitude de la PR quelque soit l'intensité incidente. L'importance de cette diminution est cependant sans doute sous-estimée.

Influence du recuit d'une lamelle de NPs sur la photo-réduction

Nous avons vu dans la partie précédente que l'amplitude de PR pouvait être diminuée d'au moins 25% par un traitement thermique à 1000°C . Ce traitement des NPs a été réalisé dans une matrice de silice. Nous avons voulu savoir si nous pouvions retrouver cette diminution de la PR en utilisant une autre méthode de recuit. Nous déposons des NPs sur une lamelle de silice puis cette lamelle est mise dans un four avec un temps de montée à 1000°C de 2 heures et un plateau à 1000°C de 1 heure puis une redescente en une dizaine d'heures.

Nous indiquons les résultats de PR pour une lamelle sans traitement et avec traitement dans la Fig. 3.28 (figure de gauche courbes en bas et en haut, respectivement). Nous vérifions de plus l'effet de l'ajout d'une solution de H_2O_2 à $25 \mu\text{M}$ (figure de droite).

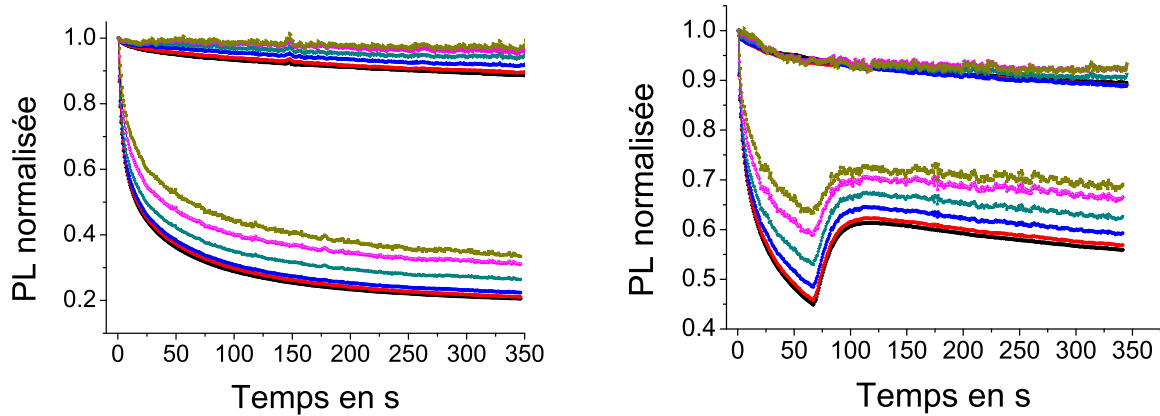


FIG. 3.28 – Effet du recuit sur les déclins de fluorescence normalisés pour 6 intensités différentes avant et après recuit d'une lamelle avec des NPs déposées à la tournette (gauche). Effet du recuit sur le recouvrement lié à l'injection de H_2O_2 ($25 \mu\text{M}$, à $t=70 \text{ s}$). NPs dopées à 20%, excitation : 466 nm , détection : 617 nm , $I_{inc}=[0.7, 1.1, 1.6, 2, 2.4, 2.5] \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp}=500 \text{ ms}$.

Sur la figure de gauche, l'effet du recuit est encore plus nette que par la méthode de recuit dans une matrice de silice : on observe une réduction par un facteur 14 de l'amplitude de la

PR. Sur la figure de droite, on observe que l'effet de H_2O_2 est complètement annulé sur les NPs recuites comme on pouvait s'y attendre en notant que sans espèces réduites l'oxydant n'a aucun effet sur la PL.

Nous ne savons pas pour l'instant quelle est l'origine de cette baisse de la PR. Des expériences sont en cours pour clarifier ce point.

Ces deux traitements ont montré que les défauts cristallins jouent un rôle primordial dans la PR des ions Europium trivalents. Nous chercherons dans la section suivante à déterminer la nature de ces défauts.

Résultat 13 : En effectuant le recuit sur des NPs déposées sur une lamelle, nous obtenons une diminution de la PR d'un facteur 14 bien plus importante que celle que nous avons obtenu par recuit dans une matrice de silice. Le résultat essentiel est que l'impact de la réduction du nombre de défauts cristallins lors du traitement thermique sur la PR est confirmé et que nous pouvons estimer que les défauts sont probablement l'espèce qui donne l'électron aux ions Europium.

La section suivante s'efforcera de donner un cadre d'interprétation unifié à ces résultats expérimentaux. Un modèle exprimé sous forme de système d'équations différentielles sera ensuite proposé ainsi que certaines simplifications du modèle afin de résoudre ces équations de manière analytique.

3.2.5 Interprétation du photoblanchiment

A partir des expériences complémentaires précédentes, nous allons à présent proposer un mécanisme expliquant le photoblanchiment. La nature des défauts cristallins sera envisagée dans un second temps.

Résultats essentiels

Nous résumons tout d'abord les résultats essentiels. Le photoblanchiment des NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$ est un mécanisme photo-induit présentant des constantes de temps caractéristiques s'étendant sur plusieurs ordres de grandeur (résultat 3). Ce photoblanchiment est entièrement lié à un mécanisme de photo-réduction des ions Europium trivalents initialement présent dans la structure cristalline (résultats 6,7,8,9,10). La photo-réduction s'explique certainement par le transfert d'un électron d'un défaut cristallin vers l'ion Europium (résultats 12, 13). La

dynamique de photo-réduction peut être séparée en deux : une dynamique initiale et rapide liée à la photo-réduction des ions Europium du coeur de la NP et une dynamique plus lente liée aux ions Europium proches de la surface (résultats 10, 11).

Nous faisons l'hypothèse dans la suite que les défauts sont les donneurs d'électrons dans la structure.

Mouvement des électrons dans la structure

Nous avons montré aussi que les électrons doivent pouvoir se déplacer dans la structure cristalline afin que le pouvoir oxydant de H_2O_2 affecte à la fois les ions Europium de surface sur lesquels H_2O_2 peut agir directement et ceux du coeur de la NP (résultat 7).

Nous montrerons dans le chapitre 6 que le laser a un double effet sur la PL des NPs. Lorsque le laser est réglé à 466 nm, le premier effet est d'exciter les ions Europium par la transition ${}^7F_{0,1} - {}^5D_2$. Un second effet non résonnant avec cette transition se superpose à ce premier effet. Nous verrons que si les NPs sont soumises à une oxydation par H_2O_2 sans être illuminées, le recouvrement de luminescence est faible. En revanche, si une excitation à des longueurs d'onde différentes de 466 nm est ajoutée à cette oxydation (472 nm, 488 nm, 501 nm), le recouvrement est plus important et plus rapide comparativement au cas sans illumination. Ceci implique qu'une illumination à 466 nm ne provoque pas que l'excitation des ions Europium ; elle provoque aussi le mouvement des électrons responsable de l'oxydation des ions Europium divalents de surface et de coeur. Ceci est à rapprocher du résultat 2 pour lequel un recouvrement de la PL est observé en illuminant les NPs à 457 ou 476 nm. Nous estimons que le mécanisme sous-jacent à ce recouvrement (sans H_2O_2) est le même que la facilitation du recouvrement due à H_2O_2 . En excitant à 457 ou 476 nm, le mouvement des électrons est facilité et notamment le mouvement d'un électron d'un ion Europium divalent vers un défaut cristallin ou vers un autre site. Puisque les ions Europium trivalents ne sont pas excités à ces longueurs d'onde, les électrons ne peuvent pas être acceptés par les ions trivalents : globalement, on assiste à une augmentation du nombre d'ions trivalents dans la structure et donc à une remontée du signal de PL.

Présence de défauts de surface

Intéressons nous à présent aux expériences portant sur la relation entre la PR, la taille des NPs et la température (résultats 4, 5). Le mécanisme proposé précédemment ne peut

pas expliquer pourquoi nous observons une PR plus faible pour les faibles tailles de NPs. Une première hypothèse serait de considérer une densité de défauts plus faible pour les plus petites tailles. Cependant, à mesure que la taille diminue on s'attendrait plutôt à ce que le nombre de défauts augmente du fait de la présence de la surface qui impose des contraintes sur l'arrangement structural.^[37] Nous écartons donc cette hypothèse.

L'équipe du LPMC a montré que, dans la structure orthovanadate, sont présents des défauts cristallins de volume qui sont dans notre cas à l'origine de la PR mais aussi de surface.^[37] Cette équipe a aussi montré que ces défauts de surface pouvaient capter l'énergie créée lors de l'excitation des NPs dans l'UV. Nous rappelons en effet qu'un autre moyen d'excitation existe pour les ions Europium. Il consiste en l'excitation des ions vanadates qui se traduit par la création d'un exciton pouvant migrer thermiquement jusqu'à un ion Europium et dont l'énergie peut promouvoir l'ion Europium vers son état excité. La présence de ces défauts de surface est peut être l'explication de la baisse de la PR observée pour les plus petites NPs. En effet, à mesure que la taille baisse, l'électron initialement présent sur un défaut cristallin aura de plus en plus de chances d'être capté par un défaut de surface et donc de ne pas être capté par un ion Europium trivalent. Ceci aboutira donc à une baisse de la PR pour les plus faibles tailles.

Ce mécanisme permet également d'expliquer pourquoi nous observons une baisse de la PR lorsque la température augmente. En effet, le mécanisme proposé initialement ne peut pas expliquer ce rôle de la température, il aurait même plutôt tendance à aboutir à une dépendance inverse. Si la température augmente, le mouvement des électrons est facilité. En augmentant le parcours moyen de l'électron dans la structure, défini comme la distance moyenne sur laquelle se déplace un électron avant d'être capté par un défaut, l'augmentation de la température va faciliter la captation de l'électron par les ions Europium trivalents, ceci conduira à une augmentation de la PR. En revanche, si nous tenons compte de la présence de défauts de surface, l'augmentation du parcours moyen de l'électron aboutira à une probabilité plus grande qu'un électron initialement éloigné de la surface soit capté par ces défauts : ceci aboutira globalement à une baisse de la PR. Nous pouvons de plus proposer un autre mécanisme pour cette dépendance en température. Elle pourrait tout aussi bien refléter une probabilité plus grande que l'électron soit dépiégé de l'ion Europium divalent, aboutissant alors à un ralentissement de la PR.

Effet du nombre limité de défauts de volume

Nous abordons à présent l'origine du caractère multi-exponentiel de la PR. Nous verrons que la large distribution de constantes de temps de PR (résultat 1) et la saturation de l'amplitude de PR pour les fortes intensités (résultat 3) peuvent être expliquées par le nombre limité de défauts de volume.

Nous avons vu que la valeur de saturation de l'amplitude de PR diminuait à mesure que la température de recuit augmentait (résultats 12, 13). Ceci indique que lorsque on diminue le nombre de défauts à l'intérieur de la structure, l'amplitude de la PR diminue. Une explication plausible serait que l'amplitude maximale de PR soit justement liée au nombre de défauts limité dans la structure. En effet, lorsque tous les défauts ont donné leurs électrons aux ions Europium trivalents, la PR ne peut plus se poursuivre : on obtient alors une saturation de la PR pour les très fortes intensités incidentes. De plus, on pourrait aussi suggérer que la quasi-stationarité du signal de PL est liée à un équilibre entre la photo-réduction et le dépiégeage des électrons des ions Europium divalents induit par l'absorption non-résonante avec les niveaux d'énergie des ions Europium trivalents. Dans ce cas de figure et dans la mesure où ces deux phénomènes sont photo-induits, nous ne devrions pas observer de saturation pour les fortes intensités. Nous estimons donc que cette saturation dépend uniquement du nombre limité de défauts dans la structure (Cf. section 3.3).

Ceci amène à considérer le caractère multi-exponentiel sous un angle nouveau. Nous avons vu que sous l'effet du laser les électrons pouvaient se mouvoir dans la structure. Ceci implique qu'à mesure que la densité en donneurs d'électrons (les défauts) diminue, le nombre d'électrons dans la structure susceptibles de réduire les ions Europium trivalents diminue aussi. Nous nous retrouvons donc dans un cas similaire à une réaction chimique bimoléculaire où les deux réactifs ont des concentrations proches. Dans ce cas de figure, l'évolution de la concentration d'un des réactifs n'est pas décrit par une simple fonction exponentielle mais par une fonction du type Becquerel. Ceci est donc à rapprocher des résultats sur le bon accord entre la fonction de Becquerel et les courbes de PL (résultat 1). Nous verrons dans la section 3.3 portant sur la modélisation de la PR que le caractère multi-exponentiel de la PR peut être effectivement expliqué par la raréfaction du nombre de défauts non-ionisés. Nous emploierons cependant une fonction différente de celle de Becquerel mais qui décrit aussi ce mécanisme de raréfaction.

Nature des défauts cristallins

Nous abordons enfin la nature des défauts cristallins de volume dont la présence entraîne la PR des ions Europium trivalents. On distingue classiquement deux types de défauts : les défauts ponctuels et ceux arrangés en structure 2D ou 3D de type dislocation. Parmi les défauts ponctuels, on distingue aussi les défauts de Schottky où un atome d'un site cristallin à l'intérieur de la structure est transféré à l'extérieur de la structure, ou ceux de Frenkel, un atome d'un site cristallin est déplacé sur un site interstitiel.^[56] Dans le cas des nanoparticules de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$ aucune étude, à notre connaissance, n'indique quelle est la nature des défauts cristallins associés à la structure orthovanadate.

En revanche, dans le cas de matériaux massifs, plusieurs études des défauts ont été menées motivées notamment par l'utilisation de la structure $\text{YVO}_4\text{:}(\text{Nd}^{3+} \text{ ou } \text{Eu}^{3+})$ en tant que milieu amplificateur pour les lasers solides.

Hu *et al*^[57] ont montré qu'il existait essentiellement les types de défauts suivants : des centres colorés dus à la présence de lacunes d'oxygène, des inclusions d'autres structures cristallines (Y_2O_3 , V_2O_5 , V_2O_3 , YVO_3), des domaines cristallins se manifestant par des dislocations entre ces sous-régions, des striations causés par des différences de concentration en Nd^{3+} . Notons que la croissance de ces cristaux est conduite à haute température (autour de 2000K) ce qui est différent de la synthèse effectuée à basse température par l'équipe du LPMC. Dans le cas des NPs, l'incorporation des ions Europium est quantitative et homogène dans la structure et il n'y a pas de coexistence de plusieurs phases cristallines différentes. Ceci laisse donc une possibilité essentielle à savoir les centres colorés dus à la présence de lacunes d'oxygène. Hu *et al* montrent de plus que ces centres colorés ont une bande d'absorption large entre 350 et 500 nm. Ceci pourrait donc représenter la bande d'absorption large non-résonante avec les niveaux d'énergie des ions Europium trivalents. Ryba-Romanowski *et al*^[58] ont montré aussi que le vanadadium pouvait exister sous la forme V^{4+} ou V^{3+} différente donc de la forme native V^{5+} . Apparemment, la présence conjointe de centres colorés et d'ions vanadates de plus faible nombre d'oxydation est une propriété communément admise pour la structure orthovanadate. Il semble cependant que la présence de centres colorés soit la plus probable.

Ainsi, un transfert d'électrons est possible entre soit une lacune d'oxygène soit l'ion Vanadium et l'ion Europium trivalent. En tenant compte des notations de Kroger et Vink^[59], on peut écrire ce transfert sous la forme de réactions chimiques ce qui donne par exemple dans

le cas de la lacune d'oxygène :



La première ligne représente le processus selon lequel une lacune d'oxygène se crée pendant la synthèse (V_O^\times , V pour vacancy et O en indice pour le site qu'occupe cette lacune). La lacune d'oxygène pouvant fournir deux électrons^[59], elle peut être doublement ionisée (V_O^\times puis $\text{V}_\text{O}^\bullet$). Dans ces notations, le x représente la neutralité de l'élément par rapport à son état initial, le "•" représente une charge positive en plus et le "''" une charge négative en plus.

Si le défaut correspond à une lacune d'oxygène, notons enfin qu'il faut afin d'assurer l'électroneutralité de la structure qu'un atome de Vanadium, d'Yttrium ou d'Europium soit rajouté à la structure en position interstitielle par exemple.

Nos données expérimentales ne nous permettent pas de trancher en faveur de l'une ou l'autre des possibilités. En revanche, il semble que la présence de défauts qui sont susceptibles de donner un ou plusieurs électrons est une propriété caractéristique de ce type de structure. Ceci conforte donc notre interprétation de la PR en termes de défauts donneurs d'électrons.

Nous nous limiterons dans la suite à considérer un défaut nommé A pouvant donner un électron. Plus exactement, nous faisons en fait l'hypothèse que les défauts cristallins sont associés par exemple à des centres colorés de type F^+ ou F , *i. e.* un ou deux électrons localisés sur une lacune d'oxygène.^[56]

Nous avons dans cette section tenté de donner au photoblanchiment un cadre unifié permettant de rendre compte de ces expériences. Nous abordons dans la section suivante la modélisation de ces phénomènes puis à l'aide de quelques simplifications du modèle complet nous comparerons le modèle aux résultats expérimentaux.

3.3 Modélisation du photoblanchiment

3.3.1 Modèle sans simplifications

Nous commençons par présenter un modèle complet du photoblanchiment. Nous avons vu que les NPs pouvaient être considérées comme étant constituées de deux sous-régions distinctes. L'une représente le coeur de la NP pour laquelle une PR rapide a été observée et l'autre la surface de la NP avec une PR plus lente (résultats 10, 11). Nous notons ces deux sous-systèmes par l'indice c pour le coeur et s pour la surface. Le nombre total d'ions Europium trivalents est noté N_{Eu}^0 et réparti selon les fractions α_c et α_s avec $\alpha_c + \alpha_s = 1$. Nous supposons de plus que le parcours moyen des électrons dans la structure est suffisamment faible pour considérer que les électrons restent confinés dans les deux régions.

Dans les deux systèmes, nous avons le schéma global de la Fig. 3. 29 : avec ω , τ , τ_{ox} et τ_{red}

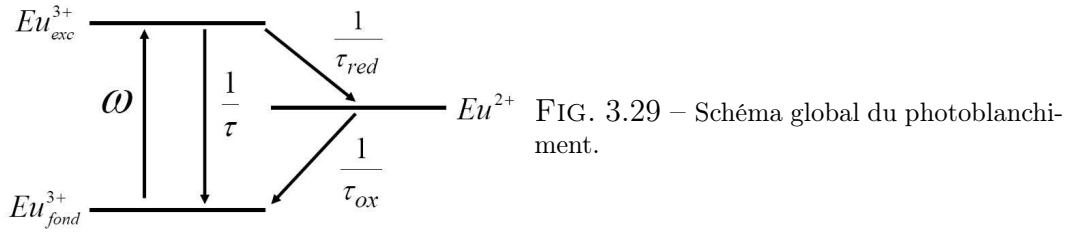


FIG. 3.29 – Schéma global du photoblanchiment.

représentant respectivement la probabilité de transition fondamental-excité, le temps de vie du niveau excité, le temps caractéristique d'oxydation de l'Europium et le temps caractéristique de réduction.

A ce schéma sont associées les équations différentielles suivantes pour le nombre d'ions trivalents dans l'état fondamental ($[Eu_{fond}^{3+}]$) et excité ($[Eu_{exc}^{3+}]$) et d'ions divalents ($[Eu^{2+}]$) :

$$\frac{d[Eu_{fond}^{3+}]}{dt} = -\omega[Eu_{fond}^{3+}] + \frac{1}{\tau}[Eu_{exc}^{3+}] + \frac{1}{\tau_{ox}}[Eu^{2+}] \quad (3.21)$$

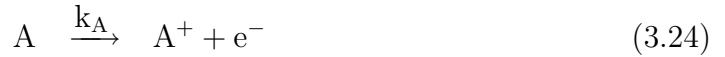
$$\frac{d[Eu_{exc}^{3+}]}{dt} = \omega[Eu_{fond}^{3+}] - \frac{1}{\tau}[Eu_{exc}^{3+}] - \frac{1}{\tau_{red}}[Eu_{exc}^{3+}] \quad (3.22)$$

$$\frac{d[Eu^{2+}]}{dt} = \frac{1}{\tau_{red}}[Eu_{exc}^{3+}] - \frac{1}{\tau_{ox}}[Eu^{2+}]. \quad (3.23)$$

Si τ_{red} et τ_{ox} ne dépendaient pas du temps, ce système ne pourrait donner en aucune manière une décroissance multi-exponentielle telle que celle que nous observons pour le photoblanchi-

ment et ce même si nous considérons des temps de vie différents pour le coeur et la surface de la NP. Or comme nous l'avons vu dans la section précédente τ_{red} et τ_{ox} doivent dépendre du temps puisque le nombre de défauts ($[A]$) dans la structure susceptible de donner et d'accepter un électron varie au cours du temps. Ces deux temps sont caractérisés comme suit.

Pour le processus de réduction, les réactions chimiques suivantes peuvent être écrites avec A les défauts de volume :



Ici, la diffusion des électrons dans le réseau n'apparaît pas. Cependant, le temps de vie de ces électrons dans la structure peut être donné notamment par le rapport des deux constantes de réaction k_A et k_{Eu} .

De même, pour le processus d'oxydation, on peut écrire :



Notons que l'une au moins de ces constantes de réaction doit dépendre de l'illumination laser (résultat 2). Notons qu'il est en fait transparent pour cette modélisation de considérer une transformation de l' Eu^{2+} vers l'état excité ou fondamental de l' Eu^{3+} .

De plus, les défauts de surface D qui sont responsables de la diminution de la PR pour les tailles de NPs faibles entraînent aussi des variations du nombre d'électrons susceptibles de réduire les ions Europium trivalents excités. Nous écrivons cette réaction comme suit :



Notons que le k_D^* est très certainement beaucoup plus faible lorsque l'on considère les électrons dans la région centrale.

Nous incluons alors ces dernières équations avec les constantes de réaction associées dans le système d'équations différentielles précédents (eq. 3.21 à 3.23). Nous notons par un indice i tous les paramètres qui peuvent changer lorsque l'on considère les ions Europium du coeur

et de la surface de la NP.

$$\begin{aligned}
\frac{d[Eu_{fond}^{3+}]_i}{dt} &= -\omega[Eu_{fond}^{3+}]_i + \frac{1}{\tau_i}[Eu_{exc}^{3+}]_i + k_{Eu i}^*[Eu^{2+}]_i \\
\frac{d[Eu_{exc}^{3+}]_i}{dt} &= \omega[Eu_{fond}^{3+}]_i - \frac{1}{\tau_i}[Eu_{exc}^{3+}]_i - k_{Eu i}[e^-]_i[Eu_{exc}^{3+}]_i \\
\frac{d[Eu^{2+}]_i}{dt} &= k_{Eu i}[e^-]_i[Eu_{exc}^{3+}]_i - k_{Eu i}^*[Eu^{2+}]_i \\
\frac{d[e^-]_i}{dt} &= k_{Ai}[A]_i - k_{Eu i}[Eu_{exc}^{3+}]_i[e^-]_i - k_{Ai}^*[A^+]_i[e^-]_i + k_{Eu i}^*[Eu^{2+}]_i - k_D^*[D][e^-]_i \\
\frac{d[A]_i}{dt} &= -k_{Ai}[A]_i + k_{Ai}^*[A^+]_i[e^-]_i \\
\frac{d[A^+]_i}{dt} &= k_{Ai}[A]_i - k_{Ai}^*[A^+]_i[e^-]_i \\
\frac{d[D]}{dt} &= -\sum_i k_{Di}^*[D][e^-]_i
\end{aligned} \tag{3.29}$$

A ce système s'ajoute le nombre d'espèces initiales :

$$[Eu_{fond}^{3+}]_c = \alpha_c N_{Eu}^0 \quad [Eu_{fond}^{3+}]_s = \alpha_s N_{Eu}^0 \quad [D] = D^0 \quad [A]_s = A_s^0 \quad [A]_c = A_c^0 \tag{3.30}$$

$$\forall i \quad [Eu_{exc}^{3+}]_i = [Eu^{2+}]_i = [e^-]_i = [A^+]_i = 0 \tag{3.31}$$

Nous pouvons décrire ce système en faisant deux analogies. La première correspond à une réaction chimique en solution où une molécule excitée (ici Eu_{exc}^{3+}) pourrait être réduite par un donneur d'électron (ici l'espèce A) à l'aide d'un transfert d'électron se faisant via le solvant (ici le réseau).^[60] Notons que dans cette analogie, les deux espèces n'ont pas nécessairement besoin d'être en contact direct. Cependant, les espèces sont censés se mouvoir dans le solvant ce qui n'est bien sûr pas notre cas. La seconde analogie est celle d'un semiconducteur où après excitation des électrons dans la bande de conduction, un piégeage d'électrons par un défaut peut intervenir. La dynamique de capture de cet électron dépend alors du nombre d'électrons dans la structure ainsi que du nombre de pièges libres.^[61]

En tenant compte du nombre d'électrons dans la structure, on voit apparaître un système d'équations différentielles non-linéaires difficile à résoudre numériquement sans connaître les valeurs des constantes de réaction. Nous proposons alors des simplifications basées essentiellement sur les résultats expérimentaux présentés précédemment.

3.3.2 Simplifications et hypothèses

- Dans la mesure où nous sommes surtout intéressés par les NPs facilement détectables, nous restreignons tout d'abord notre étude aux cas des NPs les plus grosses ($D > 20 \text{ nm}$) pour lesquelles la taille n'influence plus la PR. Dans ce cas, l'influence des défauts de surface devient négligeable : nous fixons alors D^0 à 0.

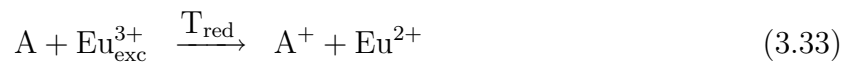
- Une première simplification consiste à repérer que ce système d'équations présente deux échelles de temps bien séparés. La première échelle de temps correspond à l'absorption et à l'émission de photons. Typiquement, pour ce type de NPs, un état quasi-stationnaire se met en place au bout de quelques multiples de τ *i. e.* au bout de quelques milisecondes. La seconde échelle de temps est de l'ordre de grandeur de la PR dont les temps caractéristiques s'étendent de quelques secondes à plusieurs milliers de secondes. Il y a donc un facteur d'au moins 1000 entre ces deux échelles de temps.

Pour séparer ces échelles, on écrit d'abord le système d'équations sans PR, on extrait de sa résolution la fonction décrivant le nombre d'ions Europium excités de laquelle on déduit la valeur stationnaire de ce nombre. Ensuite, on réinjecte cette valeur dans le système d'équations tenant compte de la PR exprimé en fonction du nombre total d'ions Europium trivalents ($[N_{Eu}^{3+}]$).

Nous donnons directement le résultat pour la valeur stationnaire de $[\text{Eu}_{exc}^{3+}]$ (Cf. éq. 2.10 avec $\omega\tau_i \ll 1$) :

$$[\text{Eu}_{exc}^{3+}]_{stat} = \frac{\omega[N_{Eu}^{3+}]_i}{\omega + \frac{1}{\tau_i}} = \omega\tau_i[N_{Eu}^{3+}]_i \quad (3.32)$$

- La deuxième simplification, qui relève en fait plus de l'hypothèse, est de se placer à un niveau supérieur de description. On va se placer en quelque sorte au dessus de la description de la PR en termes d'émission et de capture d'électrons. On suppose que l'interaction entre un défaut cristallin et l'état excité de l'ion Europium trivalent se fait directement. Ceci revient à écrire que la vitesse de disparition de l'ion trivalent est guidée uniquement par le nombre d'ions trivalents excités et le nombre de défauts libres. On définit alors deux nouveaux temps caractéristiques T_{red} et T_{ox} intervenant dans les réactions suivantes :



Les équations différentielles associées à ces deux processus et au processus d'absorption-emission s'en déduisent et s'écrivent :

$$\begin{aligned}
\frac{d[Eu_{fond}^{3+}]_i}{dt} &= -\omega[Eu_{fond}^{3+}]_i + \frac{1}{\tau_i}[Eu_{exc}^{3+}]_i + \frac{1}{T_{oxi}}[Eu^{2+}]_i[A^+]_i \\
\frac{d[Eu_{exc}^{3+}]_i}{dt} &= \omega[Eu_{fond}^{3+}]_i - \frac{1}{\tau_i}[Eu_{exc}^{3+}]_i - \frac{1}{T_{redi}}[Eu_{exc}^{3+}]_i[A]_i \\
\frac{d[Eu^{2+}]_i}{dt} &= \frac{1}{T_{redi}}[Eu_{exc}^{3+}]_i[A]_i - \frac{1}{T_{oxi}}[Eu^{2+}]_i[A^+]_i \\
\frac{d[A]_i}{dt} &= -\frac{1}{T_{redi}}[Eu_{exc}^{3+}]_i[A]_i + \frac{1}{T_{oxi}}[Eu^{2+}]_i[A^+]_i \\
\frac{d[A^+]_i}{dt} &= \frac{1}{T_{redi}}[Eu_{exc}^{3+}]_i[A]_i - \frac{1}{T_{oxi}}[Eu^{2+}]_i[A^+]_i
\end{aligned} \tag{3.35}$$

En additionnant les deux premières équations différentielles, on extrait la variation du nombre d'ions Europium trivalents ($[N_{Eu}^{3+}]_i$) dans les deux systèmes (i) :

$$\frac{d[N_{Eu}^{3+}]_i}{dt} = +\frac{1}{T_{oxi}}[Eu^{2+}]_i[A^+]_i - \frac{1}{T_{redi}}[Eu_{exc}^{3+}]_i[A]_i. \tag{3.36}$$

En tenant compte de la conservation du nombre d'Europium (N_{Eu}^0) et du nombre de défauts (A_i^0), cette équation se simplifie en :

$$\frac{d[N_{Eu}^{3+}]_i}{dt} = +\frac{1}{T_{oxi}}(N_{Eu}^0 - [N_{Eu}^{3+}]_i)(A_i^0 - [A]_i) - \frac{1}{T_{redi}}[Eu_{exc}^{3+}]_i[A]_i. \tag{3.37}$$

De plus, en remplaçant $[Eu_{exc}^{3+}]_i$ par sa valeur stationnaire (éq. 3.32) dans l'équation précédente, on obtient :

$$\frac{d[N_{Eu}^{3+}]_i}{dt} = +\frac{1}{T_{oxi}}(N_{Eu}^0 - [N_{Eu}^{3+}]_i)(A_i^0 - [A]_i) - \frac{\omega\tau_i}{T_{redi}}[N_{Eu}^{3+}]_i[A]_i. \tag{3.38}$$

En notant que $\forall t \quad \frac{d[A]_i}{dt} = \frac{d[N_{Eu}^{3+}]_i}{dt}$, l'équivalence suivante s'en déduit :

$$N_{Eu}^0 - [N_{Eu}^{3+}]_i = A_i^0 - [A]_i. \tag{3.39}$$

En remplaçant dans l'équation 37 la variable $[A]_i$, on aboutit à :

$$\frac{d[N_{Eu}^{3+}]_i}{dt} = +\frac{1}{T_{oxi}}(N_{Eu}^0 - [N_{Eu}^{3+}]_i)^2 - \frac{1}{T_{red1i}}[N_{Eu}^{3+}]_i([N_{Eu}^{3+}]_i + A_i^0 - N_{Eu}^0) \tag{3.40}$$

où on a défini par commodité :

$$\frac{1}{T_{red1i}} = \frac{\omega\tau_i}{T_{redi}}. \quad (3.41)$$

- Enfin, nous faisons une dernière simplification en supposant que la densité du nombre de défauts est la même dans le coeur et la surface des NPs. Nous reviendrons plus loin sur cette simplification.

Ceci conduit aux deux équations différentielles suivantes décrivant l'évolution du nombre d'ions Europium contenus dans les deux sous-régions, s et c :

$$\frac{d[N_{Eu}^{3+}]_c}{dt} = +\frac{1}{T_{oxc}}(N_{Euc}^0 - [N_{Eu}^{3+}]_c)^2 - \frac{1}{T_{red1c}}[N_{Eu}^{3+}]_c([N_{Eu}^{3+}]_c + A^0 - N_{Euc}^0) \quad (3.42)$$

$$\frac{d[N_{Eu}^{3+}]_s}{dt} = +\frac{1}{T_{oxs}}(N_{Eus}^0 - [N_{Eu}^{3+}]_s)^2 - \frac{1}{T_{red1s}}[N_{Eu}^{3+}]_s([N_{Eu}^{3+}]_s + A^0 - N_{Eus}^0). \quad (3.43)$$

Cette équation différentielle a la forme d'une équation de Riccati. Cette équation possède une solution analytique et nous allons dans les sections suivantes résoudre cette équation dans deux cas. Nous avons vu que l'amplitude du recouvrement était faible dans le cas de l'excitation non résonante. Nous en avons déduit que la réoxydation devait être présente aussi lorsque nous excitons les ions Europium de manière résonante mais ce de manière faible. Il convient donc tout d'abord de traiter le cas sans recouvrement ($T_{ox} \rightarrow \infty$) que nous nommons "modèle simplifié sans retour". Nous avons ensuite résolu l'équation avec l'oxydation. Nous n'avons cependant pas encore pu utiliser le cas avec recouvrement ("modèle simplifié avec retour") pour ajuster nos données expérimentales en raison du trop grand nombre de paramètres à considérer. Le but des deux sections suivantes est de proposer une fonction analytique décrivant la PR et d'exprimer les courbes de photoblanchiment de NPs individuelles en termes de constantes d'oxydation, de réduction et de nombre de défauts dans la structure.

3.3.3 Modèle simplifié sans retour

Dans cette section, l'équation différentielle dans le cas $T_{ox} \rightarrow \infty$ sera résolue. L'évolution du nombre de photons détectés sera alors déduite de la solution de l'équation différentielle. Cette évolution sera alors ajustée aux courbes expérimentales. Nous discuterons enfin l'accord entre théorie et expérience.

Evolution théorique du nombre d'ions Europium trivalents

Sans oxydation, il faut résoudre l'équation du type :

$$\frac{d[N_{Eu}^{3+}]_i}{dt} = -q_{1i}[N_{Eu}^{3+}]_i - q_{2i}[N_{Eu}^{3+}]_i^2 \quad \text{avec} \quad q_{1i} = \frac{A_i^0 - N_{Eu i}^0}{T_{red1i}} \quad q_{2i} = \frac{1}{T_{red1i}} \quad (3.44)$$

Ceci est une équation de Bernoulli et se résout facilement en posant $z_i = 1/[N_{Eu}^{3+}]_i$. En faisant la substitution, on trouve une nouvelle équation différentielle mais cette fois linéaire :

$$\frac{dz_i}{dt} = q_{1i}z_i + q_{2i} \quad (3.45)$$

En la résolvant puis en faisant la substitution inverse, on trouve (λ une constante d'intégration) :

$$[N_{Eu}]_i = \frac{1}{-\frac{q_2}{q_1} + \lambda \exp q_1 t} \quad (3.46)$$

Enfin, en notant qu'initialement on a $N_{Eu i}^0$ ions Europium et en remplaçant q_1 et q_2 , on trouve :

$$[N_{Eu}^{3+}]_i = \frac{N_{Eu i}^0}{\left(1 + \frac{N_{Eu i}^0}{A_i^0 - N_{Eu i}^0}\right) \exp \frac{A_i^0 - N_{Eu i}^0}{T_{red1i}} t - \frac{N_{Eu i}^0}{A_i^0 - N_{Eu i}^0}}. \quad (3.47)$$

De plus, si la densité de défauts est la même dans le coeur et la surface on peut définir la proportion, α , du nombre de défauts par rapport au nombre d'ions Europium de telle manière à ce que nous ayons :

$$\frac{A_c^0}{N_{Eu c}^0} = \frac{A_s^0}{N_{Eu s}^0} = \alpha. \quad (3.48)$$

En réarrangeant l'équation 3.47 et en introduisant α , on peut alors écrire que l'évolution du nombre total d'ions Europium ($[N_{Eu}^{3+}]$) est donnée par :

$$[N_{Eu}^{3+}] = \frac{N_{Eu c}^0}{\left(1 + \frac{1}{\alpha - 1}\right) \exp \frac{N_{Eu c}^0(\alpha - 1)}{T_{red1c}} t - \frac{1}{\alpha - 1}} + \frac{N_{Eu s}^0}{\left(1 + \frac{1}{\alpha - 1}\right) \exp \frac{N_{Eu s}^0(\alpha - 1)}{T_{red1s}} t - \frac{1}{\alpha - 1}}. \quad (3.49)$$

A partir de cette équation, nous allons déduire le nombre de photons détectés pour une NP individuelle.

Evolution théorique du nombre de photons détectés par NP

Nous savons que le nombre de photons émis (N_{ph}^{em}) dépend du nombre d'ions Europium trivalents dans l'état excité. Pour un système i, nous pouvons écrire successivement :

$$\begin{aligned} [N_{ph}^{em}]_i &= k_{ri} [Eu_{exc}^{3+}]_i \\ &= k_{ri} \omega \tau_i [N_{Eu}^{3+}]_i \end{aligned} \quad (3.50)$$

Pour les deux systèmes et selon nos hypothèses de départ, nous avons $k_{rc} = k_{rs}$. Le nombre de photons émis par ces deux systèmes s'écrit alors :

$$[N_{ph}^{em}] = k_r \omega ([N_{Eu}^{3+}]_c \tau_c + [N_{Eu}^{3+}]_s \tau_s) \quad (3.51)$$

Nous souhaitons de plus faire apparaître les proportions de photons émis pour les deux régions. Ainsi, nous écrivons :

$$[N_{ph}^{em}] = k_r \omega (N_{Eu,c}^0 \tau_c + N_{Eu,s}^0 \tau_s) \left(\frac{[N_{Eu}^{3+}]_c \tau_c}{N_{Eu,c}^0 \tau_c + N_{Eu,s}^0 \tau_s} + \frac{[N_{Eu}^{3+}]_s \tau_s}{N_{Eu,c}^0 \tau_c + N_{Eu,s}^0 \tau_s} \right) \quad (3.52)$$

Enfin, le nombre de photons détectés N_{ph}^{det} se déduit simplement du nombre de photons émis en tenant compte de l'efficacité de détection du système. Pour simplifier, nous définissons f comme le nombre de photons détectés à $t=0$. Nous aboutissons, en remplaçant dans l'équation 3.52 les valeurs de l'équation 3.49, à l'équation donnant l'évolution du nombre de photons détectés au cours du temps :

$$N_{ph}^{det}(t) = f \left(\frac{\frac{N_{Eu,c}^0 \tau_c}{N_{Eu,c}^0 \tau_c + N_{Eu,s}^0 \tau_s}}{(1 + \frac{1}{\alpha - 1}) \exp \frac{\frac{N_{Eu,c}^0 (\alpha - 1)}{T_{red1c}} t} - \frac{1}{\alpha - 1}}} + \frac{\frac{N_{Eu,s}^0 \tau_s}{N_{Eu,c}^0 \tau_c + N_{Eu,s}^0 \tau_s}}{(1 + \frac{1}{\alpha - 1}) \exp \frac{\frac{N_{Eu,s}^0 (\alpha - 1)}{T_{red1s}} t} - \frac{1}{\alpha - 1}}} \right). \quad (3.53)$$

Cette fonction possède certaines propriétés que nous allons décrire :

- Quand $t \rightarrow \infty$ et si $\alpha < 1$, cette fonction tend vers $f N_{Eu}^0 (1 - \alpha)$ i.e. vers $f(N_{Eu}^0 - A^0)$, on retrouve donc la propriété de quasi-stationnarité de l'amplitude de PR sur les temps longs.
- Cette fonction peut être ajustée correctement par une fonction de Becquerel ce qui assure d'ores et déjà que cette fonction pourra correctement décrire la PR^[52]. En d'autres

termes, elle permet de générer un caractère multi-exponentiel.

- Notons de plus qu’une fonction du même type que celle décrivant juste un sous-système (éq. 3.47) a été employée pour décrire l’annihilation triplet-triplet dans des phénomènes de phosphorescence. Cependant, à notre connaissance elle n’a jamais été utilisée pour décrire d’autres phénomènes photophysiques.
- Cette fonction comporte 8 paramètres essentiels : $N_{Eu c}^0$, τ_c , $N_{Eu s}^0$, τ_s , α , $T_{red c}$, $T_{red s}$, ω . Parmi ces paramètres, normalement seuls $T_{red c}$ et $T_{red s}$ sont inconnus. Les autres peuvent être déterminés par les (ou comparés aux) mesures sur les temps de vie notamment. Ceci semble donc correspondre à une description parcimonieuse en termes de nombre de paramètres.
- Insistons enfin, dès à présent, sur le fait que ce modèle est basé sur une seule hypothèse unique portant sur le type d’interaction entre les défauts et les ions Europium, le reste des suppositions et simplifications est basé sur des données expérimentales et notamment sur la présence de deux sous-régions dans la NP.

De cette fonction, nous déduisons une fonction d’ajustement qui sera utilisée en pratique dans le traitement des courbes expérimentales. On écrit cette fonction à l’aide de 5 paramètres a_i :

$$N_{ph}^{det}(t) = \frac{a_1}{(1 + a_2) \exp^{a_3 t} - a_2} + \frac{a_4}{(1 + a_2) \exp^{a_5 t} - a_2}. \quad (3.54)$$

En fait seuls 4 paramètres sont véritablement nécessaires, le cinquième sert juste à tenir compte du fait que la première valeur expérimentale que nous normalisons à 1 ne correspond pas à la valeur à $t=0$. De cet ajustement, nous pourrions donc extraire les informations suivantes :

$$\begin{aligned} f &= a_1 + a_4 & \alpha &= \frac{1}{a_2} + 1 & \frac{T_{red1s}}{T_{red1c}} &= \frac{a_3 a_4}{a_1 a_5} \\ \frac{N_{Eu c}^0 \tau_c}{N_{Eu c}^0 \tau_c + N_{Eu s}^0 \tau_s} &= \frac{a_1}{a_1 + a_4} & \frac{N_{Eu s}^0 \tau_s}{N_{Eu c}^0 \tau_c + N_{Eu s}^0 \tau_s} &= \frac{a_4}{a_1 + a_4} \end{aligned} \quad (3.55)$$

On pourra donc connaître la fraction du nombre de photons émis par les deux sous-systèmes (f_c et f_s), dont la valeur moyenne sur un ensemble de NP peut être indépendamment déterminée par les mesures de déclins de fluorescence.

Comparatif modèle-courbes expérimentales

Pour la comparaison entre la fonction précédente et les courbes de PL expérimentales, nous utilisons l'ensemble des données sur une seule synthèse de NPs dopées à 10%. Une partie de ces données a déjà été présentée dans les figures : 5-9, 12-13, 23, 26-27. Ces données comportent 164 courbes de PL de NPs individuelles obtenues pour des intensités incidentes différentes.

Les 164 courbes peuvent être ajustées par notre fonction théorique. Cependant, nous avons retiré 10 ajustements présentant une incertitude sur la valeur des paramètres trop importante (essentiellement pour les intensités incidentes faibles). Insistons sur les points suivants : les ajustements sont réalisés d'une part sans aucune contrainte sur les paramètres et d'autre part la valeur initiale des paramètres nécessaire pour réaliser les ajustements n'a pas d'influence sur les paramètres trouvés.

Nous montrons dans la figure suivante deux exemples d'ajustement avec les résidus moyens correspondants :

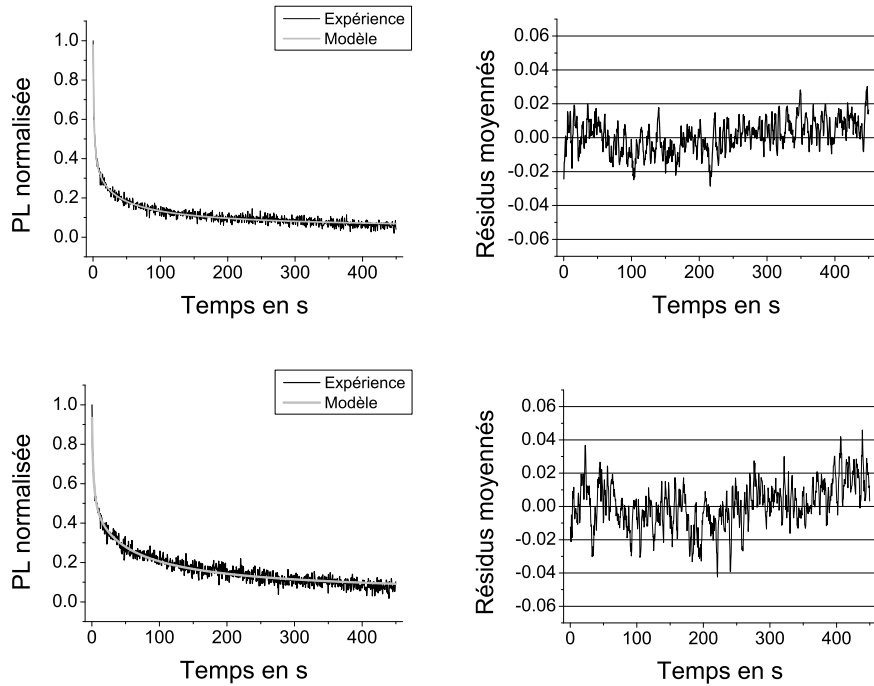


FIG. 3.30 – Ajustement des courbes de PL par la fonction théorique de PR. En haut : $a_1 = 0.78 \pm 0.006$, $a_2 = -16 \pm 0.2$, $a_3 = -0.04 \pm 0.0017$, $a_4 = 0.31 \pm 0.0053$, $a_5 = -0.0013 \pm 0.00006$. En bas : $a_1 = 0.62 \pm 0.028$, $a_2 = -23 \pm 2.7$, $a_3 = -0.026 \pm 0.0060$, $a_4 = 0.40 \pm 0.017$, $a_5 = -0.00057 \pm 0.00012$. NPs dopées 10%, $I_{inc}=20$ (en haut), 10 (en bas) $\text{kW} \cdot \text{cm}^{-2}$, $T_{exp}=500$ ms.

Au delà du fait que l'ensemble des courbes de PL puisse être ajusté par la fonction théorique, nous voyons sur ces deux exemples typiques que l'accord entre cette fonction et les courbes expérimentales est très bon, approximativement de la même qualité qu'un ajustement quadri-exponentiel (Cf Fig. 3.7).

En moyenne sur tous les ajustements effectués, l'écart-type sur chaque paramètre représente 6,4% du paramètre a_1 , 11% pour a_2 , 21% pour a_3 , 9% pour a_4 , 70% pour a_5 . Nous voyons donc que, à part pour le paramètre a_5 , l'ajustement fournit avec une précision certaine les paramètres a_i du modèle.

Nous donnons dans un premier temps les valeurs des paramètres a_i obtenus en moyennant l'ensemble des données ; nous reviendrons ensuite sur la dépendance en intensité de ces paramètres :

$$\begin{aligned} \langle a_1 \rangle &= 0.73 \pm 0.10 & \langle a_2 \rangle &= -13 \pm 7.3 & \langle a_3 \rangle &= -0.050 \pm 0.030 \\ \langle a_4 \rangle &= 0.31 \pm 0.072 & \langle a_5 \rangle &= -0.0014 \pm 0.0012 \end{aligned} \quad (3.56)$$

Comme nous nous y attendions, deux systèmes apparaissent : celui du coeur de la NP associé à une PR rapide et d'amplitude importante et celui de surface associé à une PR plus lente et d'amplitude relative faible.

Effet de l'intensité sur la détermination des paramètres a_i

Nous cherchons à présent à savoir si la dépendance de chaque paramètre vis à vis de l'intensité incidente est celle attendue. En effet, seuls les paramètres a_3 et a_5 doivent dépendre de l'intensité (équation 3.53) pour les valeurs d'intensité faibles (Cf. Fig. 3.13). Cependant, l'ajustement aboutit à une modification des paramètres a_1 et a_4 . La figure suivante montre cette modification pour la fraction correspondant aux ions Europium de surface (a_4). Nous montrons aussi (figure de droite) un moyennage de cette fraction pour des tranches de 3 kW.cm⁻². La dépendance en intensité est claire et montre deux phases : pour les valeurs d'intensité inférieures à 15 kW. cm⁻² cette fraction décroît au fur et à mesure que l'intensité croît, pour les valeurs supérieures cette fraction est quasiment constante.

Ceci ne remet pas en cause le modèle pour la raison qui suit. Comme nous pouvons le voir sur la Fig. 3.30 du bas obtenue pour une intensité de 10 kW. cm⁻², le signal continue de décroître substantiellement à la fin de la mesure ce qui n'est pas le cas pour des intensités plus

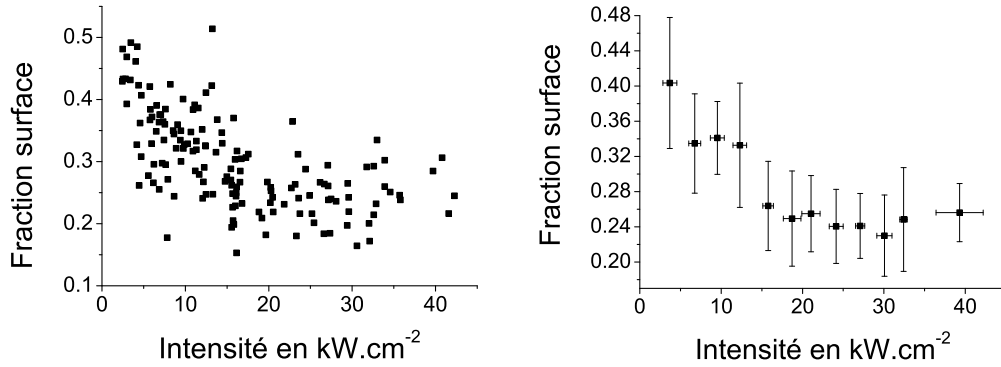


FIG. 3.31 – Effet de l'intensité sur la plus faible fraction de photons détectés. A gauche, moyennage des valeurs de fraction par tranche de $3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ NPs dopées 10%, $T_{exp}=500 \text{ ms}$.

fortes (Fig. 3.30 du haut). Nous estimons que le manque de données sur des temps très longs induit une surestimation de l'amplitude a_4 d'autant plus forte que l'intensité est faible. Pour confirmer le rôle de cet effet, nous montrons dans les figures suivantes (Fig. 3.32) l'influence de la durée d'observation de la PL sur les paramètres d'ajustement trouvés.

Plus la durée d'observation est faible, plus les paramètres, notamment a_4 , s'éloignent de leur valeur quasi-stationnaire obtenues pour des durées supérieures à approximativement 300 s. Notons que si nous traçons α et non a_2 , nous obtenons le même type de courbe montrant une saturation.

Ceci implique deux conclusions. La première est qu'il n'y a pas lieu de remettre pour l'instant notre modèle en cause et la seconde est que pour obtenir des paramètres non-biaisés il faut s'en tenir uniquement aux données obtenus pour des intensités supérieures à $15 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Nous reviendrons sur ce point dans la suite. Des mesures sur des temps très longs seront de plus effectuées prochainement pour vérifier la cohérence du modèle sur ce point.

Pour ces valeurs d'intensité, nous obtenons pour les paramètres a_i , f_c , f_s , α et $\frac{T_{red1s}}{T_{red1c}}$ les valeurs suivantes (N=74 NPs) :

$$\begin{aligned}
 \langle a_1 \rangle &= 0.80 \pm 0.054 & \langle a_2 \rangle &= -17 \pm 6.6 & \langle a_3 \rangle &= -0.048 \pm 0.022 \\
 \langle a_4 \rangle &= 0.27 \pm 0.049 & \langle a_5 \rangle &= -0.0013 \pm 0.00095 \\
 f_c &= 0.75 \pm 0.04 & f_s &= 0.25 \pm 0.04 & \alpha &= 0.93 \pm 0.025 & \frac{T_{red1s}}{T_{red1c}} &= 15 \pm 7.8(3.57)
 \end{aligned}$$

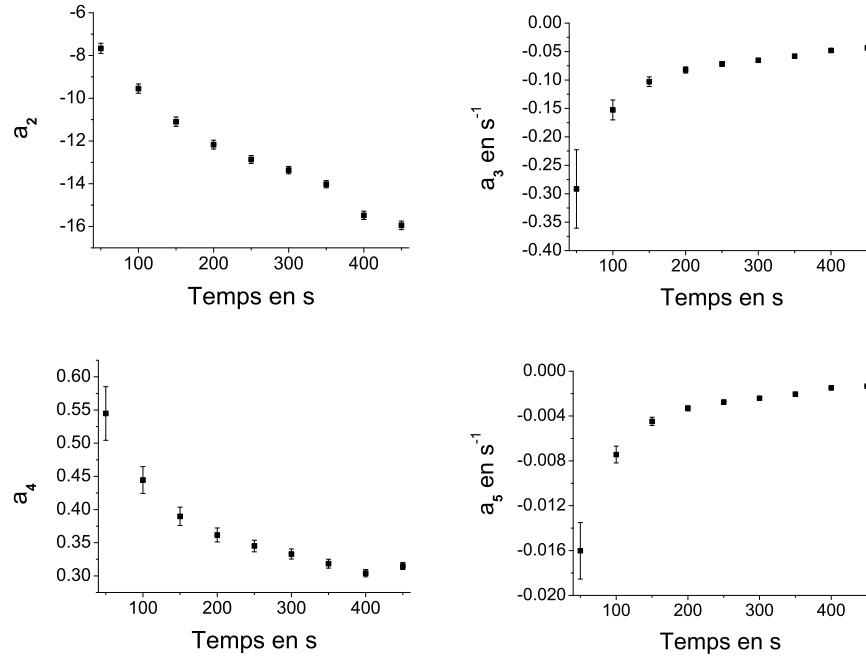


FIG. 3.32 – Effet de la durée d’observation de la PL sur la valeur des paramètres d’ajustement. NPs dopées 10%, $I_{inc}=20 \text{ kW. cm}^{-2}$ $T_{exp}=500 \text{ ms}$.

Cohérence entre paramètres de l’ajustement et mesures de DFs

Nous n’avons pas pu dans la partie précédente vérifier la cohérence du modèle par rapport à la dépendance en intensité. Nous pouvons cependant confronter les mesures de déclin de fluorescence (DF) à notre modèle. En effet, dans ces mesures de DFs nous avons déterminé que les NPs pouvaient être considérées comme constituées de deux sous régions : l’une correspondant au coeur avec un temps de vie long et une à la surface avec un temps de vie court. Ceci a été à la base de la constitution du modèle. Il s’agit à présent de vérifier que les amplitudes trouvées par les mesures de DFs et celles par l’ajustement des courbes de PR sont cohérentes.

Nous avons effectué trois mesures de DFs sur la même synthèse. Nous reportons les ajustements de ces mesures dans les équations suivantes (deux ont déjà été exposées précédemment

dans les figures 3.23 et 3.27) :

$$\begin{aligned}
 N_{mesure1} &= 0.19 \exp\left(-\frac{t}{203}\right) + 0.81 \exp\left(-\frac{t}{639}\right) \\
 N_{mesure2} &= 0.28 \exp\left(-\frac{t}{225}\right) + 0.72 \exp\left(-\frac{t}{610}\right) \\
 N_{mesure3} &= 0.26 \exp\left(-\frac{t}{198}\right) + 0.74 \exp\left(-\frac{t}{630}\right) \\
 N_{moyenne} &= 0.243_{\pm 0.047} \exp\left(-\frac{t}{204_{\pm 6}}\right) + 0.74_{\pm 0.047} \exp\left(-\frac{t}{626_{\pm 14}}\right)
 \end{aligned} \tag{3.58}$$

L'accord est tout à fait excellent : en effet, pour le coeur, les mesures sur les courbes de PR donnent $f_c = 0.75 \pm 0.040$. Ceci nous conforte dans l'idée qu'une modélisation de la PR des NPs tenant compte de deux sous systèmes est certainement utile et juste.

A l'aide des données sur les temps de vie ($\tau_c = 626 \mu\text{s}$ et $\tau_s = 204 \mu\text{s}$) et de l'équation 3.41, nous pouvons de plus estimer le rapport de T_{reds} et T_{redc} :

$$T_{reds} = \frac{T_{red1s}\tau_s}{T_{red1c}\tau_c} T_{redc}, \tag{3.59}$$

ce qui donne $T_{reds} = 4.6T_{redc}$. Le temps caractéristique de PR est donc 4.6 fois plus long pour les ions Europium de surface que pour ceux de coeur.

Enfin, à partir de l'équation 3.55 (en prenant $N_{Eu}^0 = 1$) et de la valeur des temps de vie, nous pouvons déterminer N_{Eus}^0 et N_{Euc}^0 qui valent chacun 0.50.

Cohérence entre paramètres de l'ajustement et mesures de ratio de PR

Nous souhaitons à présent vérifier la cohérence du modèle à l'aide des mesures de ratio de PR. En effet, ces mesures ont montré une dépendance particulière du ratio de PR avec l'intensité incidente (cf. Fig. 3.13). On peut se demander alors si avec les valeurs des paramètres précédents, on peut correctement reproduire cette dépendance.

Dans les équations 3.53 et 3.41, nous connaissons à présent les paramètres : f , N_{Eus}^0 , τ_s , N_{Euc}^0 , τ_c , α et ω . Seuls les paramètres T_{redc} ou T_{reds} sont inconnus. Nous déterminons T_{redc} en ajustant la fonction de l'équation 53 à la courbe de la figure 13 (moyenné par tranche de 2 kW. cm^{-2} jusqu'à 20 kW. cm^{-2} puis par tranches de 5 kW. cm^{-2}). Nous prenons de plus pour T_{reds} la valeur $4.6T_{redc}$.

Pour les valeurs de T_{redc} 0.08, 0.12 et 0.16 s l'ajustement est correct. Il en est d'ailleurs

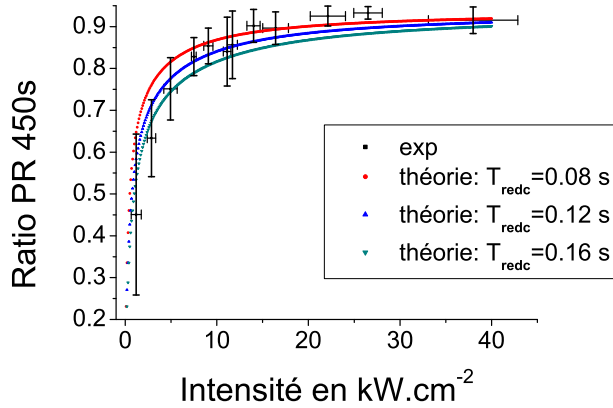


FIG. 3.33 – Comparaison du ratio de PR après 450s obtenu à partir des courbes expérimentales (Fig. 3.13) ou théoriques. NPs dopées 10%, $T_{exp}=500$ ms.

de même pour les courbes de ratio de PR à 50 s, 100 s et 200 s. Ce bon accord a une double importance. Ceci implique tout d'abord que les paramètres déterminés pour des intensités supérieures à $15 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ permettent aussi de décrire les courbes de PR pour des intensités plus faibles. Nous avons vu que la durée d'acquisition jouait un rôle dans la détermination correcte de ces paramètres d'ajustement. Ceci avait rendu impossible la détermination des dépendances en intensité des différents paramètres. L'ajustement correct observé sur la figure précédente permet donc de lever le doute sur la dépendance en intensité des paramètres a_i et donc sur la validité du modèle. Le deuxième point important est que cet ajustement permet de déterminer les derniers paramètres qui manquaient et ainsi de proposer une description complète de la PR.

Bilan du modèle simplifié sans retour et interprétation

Nous résumons tout d'abord les valeurs moyennes des paramètres déterminés :

$$\begin{aligned}
 f_c &= 0.75 \pm 0.040 & N_{Eu_c}^0 &= 0.50 \pm 0.025 & T_{redc} &= 0.12s \pm 0.04s & \tau_c &= 626\mu s \pm 14\mu s \\
 f_s &= 0.25 \pm 0.040 & N_{Eu_s}^0 &= 0.50 \pm 0.025 & T_{reds} &= 0.55s \pm 0.09s & \tau_s &= 204\mu s \pm 6\mu s \\
 \alpha &= 0.93 \pm 0.025
 \end{aligned} \tag{3.60}$$

- La valeur de α indique que le nombre de défauts est égal à 0.93 fois le nombre d'ions Europium trivalents dans la structure. Nous émettons l'hypothèse que les défauts cristallins sont en fait des lacunes d'oxygène. Alors pour un taux de dopage en ions Europium de 10% et compte tenu du fait qu'il y a 4 oxygènes par ions Europium pour un dopage à 100%,

le pourcentage de lacunes d'oxygène est de 2.3% (si une lacune est associée à un électron ionisable). Ce chiffre semble raisonnable pour une synthèse conduite à basse température.^[59]

- Afin de donner des rayons caractéristiques pour les deux systèmes, nous considérons une NP sphérique de 25 nm. Les ions Europium de coeur sont alors inclus dans une sphère de 20 nm ($N_{Eu}^0 = 0.50$). Autrement dit, l'influence des hydroxyls de surface se fait ressentir sur une longueur caractéristique de 5 nm. Les ions Europium de surface ont alors en moyenne un temps de vie qui est diminuée d'un facteur trois par l'augmentation correspondante des processus non-radiatifs dans cette région. Ceci implique de plus que le parcours moyen de l'électron dans la structure ne peut excéder ces 5 nm.

- Le temps caractéristique décrivant la réduction des ions Europium du coeur de la NP est plus faible que celui des ions Europium de surface. Autrement dit, le piégeage des électrons par les ions Europium trivalents se fait plus rapidement au coeur de la NP qu'en surface.

Une première explication pourrait provenir d'une de nos hypothèses. Nous avons en effet considéré que le nombre de défauts est identique dans les deux régions. Or nous estimons que du fait de la présence de la surface si jamais ces nombres de défauts n'étaient pas identiques, nous devrions avoir un nombre de défauts plus important en surface qu'au coeur. Ceci revient à penser que nous devrions avoir un piégeage des électrons plus efficace dans le coeur qu'au niveau de la surface. Ce mécanisme considéré de manière isolé peut donc rendre compte du piégeage plus rapide des électrons pour les ions Europium du coeur de la NP. Une autre explication probable pourrait être qu'à mesure que le nombre de défauts augmente par passage du coeur à la surface, la probabilité qu'un électron soit capté par un autre défaut et non par un ion Europium pourrait aussi augmenter. Dans ce cas que l'on retrouve d'ailleurs dans les semiconducteurs dopés^[61], le temps caractéristique de piégeage pourrait être inférieur dans le coeur que dans la surface. Dans notre modèle, nous avons tenu uniquement compte du fait d'une interaction entre défauts et ions Europium guidé seulement par le nombre de ces deux espèces. Nous avons donc négligé l'efficacité avec laquelle un électron peut se propager via le réseau d'un défaut vers un ion Europium. Dans le coeur de la NP, l'environnement cristallographique des différents ions est par définition moins perturbé que celui des ions de surface. Ceci pourrait constituer une explication supplémentaire à ce piégeage plus rapide : la région située au coeur de la NP permettrait la diffusion des électrons de manière plus efficace pour le processus de réduction.

Il est important enfin de souligner que la valeur des deux temps $T_{red i}$ est certainement le

reflet de processus multiples conduisant globalement au départ de l'électron du défaut, à sa diffusion dans la structure et à sa capture par un ion Europium.

- Le bon accord entre modèle et les expériences de PR nous permet enfin de proposer un mécanisme global rendant compte de la PR. Nous faisons toujours l'hypothèse que le défaut est une lacune d'oxygène. Cette lacune peut être associée à 0, 1 ou 2 électrons. On parle de centres F pour 2 électrons et F^+ pour 1 électron.

La première question est quel est le nombre d'électrons initialement associé à une lacune d'oxygène. Nous avons vu qu'initialement les ions Europium étaient exclusivement sous la forme trivalente. Nous pouvons alors penser que la structure présente essentiellement des centres F en supposant que les ions trivalents agissent comme un réservoir d'électrons en équilibre avec les lacunes. Ensuite, l'illumination laser provoque l'excitation des ions Europium. Nos données ne nous permettent pas de savoir si les centres F sont aussi excités par cette illumination. En effet, pour tenir compte de ce phénomène, il suffirait de redéfinir T_{red1i} comme suit :

$$\frac{1}{T_{red1i}} = \frac{\omega\tau_i}{T_{red1i}} \frac{\omega_F}{\omega_F + \frac{1}{\tau_F}} \quad (3.61)$$

, où ω_F et τ_F ont les significations habituelles. A partir de nos données et notamment celles portant sur le ratio de PR en fonction de l'intensité, nous ne pouvons distinguer le cas avec ou sans absorption du centre F. En revanche, nous avons observé qu'après PR, un recouvrement induit par une illumination non-résonante avec les niveaux d'énergie des ions trivalents se produisait. Nous estimons alors que ce recouvrement est induit par l'excitation des centres F^+ qui permet le transfert des électrons des ions Europium divalents vers les centres F^+ . Ceci est en accord avec la bande d'absorption large observée dans la structure orthovanadate et associée à la présence de centres colorés. Même si ce mécanisme semble très séduisant, nos données ne nous permettent pas de confirmer notamment la présence de centres F et F^+ dans la structure orthovanadate de nos NPs, il faut donc considérer ce mécanisme comme une explication potentielle.

3.3.4 Modèle simplifié avec retour

Avec une possibilité d'oxydation des ions Europium divalents, le système peut s'écrire :

$$\begin{aligned} \frac{d[N_{Eu}^{3+}]_i}{dt} &= q_{0i} - q_{1i}[N_{Eu}^{3+}]_i - q_{2i}[N_{Eu}^{3+}]_i^2 \\ \text{avec } q_{0i} &= \frac{N_{Eu}^0}{T_{oxi}} \quad q_{1i} = \frac{1}{T_{red1i}}(A_i^0 - N_{Eu}^0) - \frac{2N_{Eu}^0}{T_{oxi}} \quad q_{2i} = \frac{1}{T_{red1i}} - \frac{1}{T_{oxi}} \end{aligned} \quad (3.62)$$

Cette équation est une équation de Riccati et se résout facilement en posant $[N_{Eu}]_i = y_{1i} + 1/z_i$ à condition qu'il existe une solution particulière y_{1i} à cette équation. Nous pouvons prendre pour solution particulière la solution constante. Nous donnons directement la solution dans la mesure où le cheminement est identique à celui utilisé pour l'équation de Bernoulli.

$$\begin{aligned} [N_{Eu}]_i &= y_{1i} + \frac{1}{\left(\frac{1}{N_{Eu}^0 - y_{1i}} + \frac{q_{2i}}{q_{1i} + 2q_{2i}y_{1i}}\right) \exp(q_{1i} + 2q_{2i}y_{1i})t - \frac{q_{2i}}{q_{1i} + 2q_{2i}y_{1i}}} \\ \text{avec } y_{1i} &= \frac{-q_{1i} \pm \sqrt{q_{1i}^2 - 4q_{0i}q_{2i}}}{2q_{2i}} \end{aligned} \quad (3.63)$$

La difficulté évidente au regard de cette équation est qu'elle inclut de nombreux paramètres. Nous n'avons pas pu pour l'instant trouver une formulation permettant de ramener le nombre de paramètres à une valeur raisonnable. Cependant l'importance de la réoxydation est faible ce qui conduit à penser que le modèle précédent donne une vision suffisante de la dynamique de PR.

La fonction de l'équation 3.63 pourrait se révéler très utile quant il s'agira de modéliser le recouvrement de la PL induit par la présence de H_2O_2 . En effet, l'introduction dans cette fonction des paramètres de réoxydation pourra alors être utilisée comme moyen de caractérisation du recouvrement induit par l'oxydant. Cette modélisation en deux sous-systèmes tiendra alors compte du fait que les ions Europium de surface sont oxydés plus rapidement que ceux du coeur de la NP.

3.4 Conclusions

Nous avons montré dans ce chapitre que le photoblanchiment des NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$ est un mécanisme photo-induit présentant des constantes de temps caractéristiques s'étendant

sur plusieurs ordres de grandeur. Ce photoblanchiment est entièrement lié à un mécanisme de photo-réduction des ions Europium trivalents initialement présent dans la structure cristalline. La photo-réduction s'explique probablement par le transfert d'un électron d'un défaut cristallin vers l'ion Europium. La dynamique de photo-réduction peut-être séparée en deux : une dynamique initiale et rapide liée à la photo-réduction des ions Europium du coeur de la NP et une dynamique plus lente liée aux ions Europium proches de la surface. Nous avons ensuite proposé un modèle permettant de rendre compte de la dynamique de PR. Ce modèle est basé essentiellement sur la prise en compte de deux sous-régions à l'intérieur de la NP présentant des temps de vie du niveau excité de l'ion Europium différents et d'un type de transfert d'électrons entre défauts et ion Europium guidé uniquement par le nombre de ces deux sous-espèces. Ce modèle est en bon accord avec les résultats expérimentaux. Toutefois, des expériences complémentaires devront être réalisées pour clarifier certains points importants. Tout d'abord, il faudra déterminer quelle est la nature des défauts cristallins. Ensuite, le mécanisme par lequel l'électron est transféré du défaut vers l'ion Europium trivalent reste encore obscur. Une information importante serait de savoir si le défaut absorbe aux longueurs d'onde utilisées. De manière symétrique, il serait intéressant de savoir si l'ion Europium divalent absorbe à ces longueurs d'onde ce qui permettrait de préciser un peu plus comment l'électron peut repartir vers le défaut.

Chapitre 4

Nanoparticules d'oxyde comme donneurs dans les expériences de FRET

4.1 Commentaires

Dans la mesure où l'article portant sur ces expériences est relativement complet, nous nous contenterons dans ce chapitre de reproduire cet article accompagné de quelques commentaires succincts.

Le premier commentaire porte sur la valeur des temps de vie des NPs dopées à 40% que nous avons utilisé pour faire les expériences de FRET. Nous trouvons pour ces NPs un rendement de 18% et un déclin de fluorescence qui peut être approximé par une double exponentielle. Ainsi, le nombre de photons émis $N_{ph}(t)$ (t en μs) et normalisé à $t = 0$ s'écrit :

$$N_{ph}(t) = 0.42 e^{-\frac{t}{130}} + 0.58 e^{-\frac{t}{331}} \quad (4.1)$$

Dans le chapitre portant sur le calcul de taille, nous avons mentionné, pour ce même type de NPs, un rendement de $\approx 12\%$ et un temps de vie, quasi-monoexponentiel qui s'écrivait :

$$N_{ph}(t) = 0.95 e^{-\frac{t}{427}} + 0.05 e^{-\frac{t}{935}} \quad (4.2)$$

Ces résultats différents obtenus pour deux synthèses différentes s'expliquent essentiellement par la variabilité de la cristallinité de ces NPs. Le mode de synthèse utilisé par l'équipe du LPMC est la chimie des colloïdes à basse température qui est certes une chimie douce

mais ne permet pas d'atteindre le même état de cristallinité que le matériau massif. Tous les paramètres liés au processus de nucléation des NPs ne sont pas encore complètement compris. Ainsi, durant ce travail de thèse nous avons utilisé des synthèses différentes en termes de cristallinité ce qui implique des différences substantielles en termes de rendement quantique et de temps de vie. Pour ce taux de dopage, les rendements observés pour différentes synthèses peuvent varier de 7% à 21% ce qui est largement au delà de l'incertitude sur la mesure du rendement ($\approx 10\%$). Nous avons de même observé des temps de vie différents pour certaines synthèses.

Le deuxième commentaire que nous voulons faire porte sur la modélisation proposée dans l'article pour expliquer la différence entre le résultat du calcul de l'efficacité de transfert E par la méthode des temps de vie du donneur avec et sans accepteur et par celle des intensités du donneur avec ou sans accepteur.

Au delà de la démonstration faite portant sur la possibilité d'observer du FRET avec ce type de NPs, cet article nous semble intéressant car il réaffirme toute la particularité de ces NPs constituées de nombreux centres émetteurs. En effet, même dans le cas du choix du mode de calcul de E , il nous faut revoir nos conceptions. Ainsi, les explications et la modélisation qui s'en sont suivies étaient tout à fait essentielles. Cependant, trois aspects n'ont pas été pris en compte, doivent être ici mentionnés et peuvent expliquer en outre les différences entre valeurs expérimentales et valeurs théoriques (fig 4-B). Le premier porte sur l'équivalence des différents donneurs. Une des hypothèses sous-jacentes à cette modélisation est que nous tenons compte d'un temps de vie moyen et d'une intensité moyenne émise par chaque centre émetteur. Or, il est évident par rapport à ce qui a été mentionné plus haut que ce n'est pas le cas pour cette synthèse. Dans les expériences futures et pour plus de précision, il nous faudra tenir compte de ce phénomène. Le deuxième porte sur le caractère homogène des positions des accepteurs à la surface des NPs. Nous avons pour des raisons de simplicité mathématique posé que les positions des accepteurs étaient homogènes par rapport à la surface d'une sphère ce qui nous a permis de définir un angle moyen séparant deux accepteurs, angle que nous avons alors reporté dans le cas d'un ellipsoïde. Pour diminuer l'effet de cette approximation, nous avons alors moyenné les calculs de E pour chaque nombre d'accepteurs pour différentes rotations globales des positions. Le troisième qui n'a aucune incidence sur les résultats est que nous avons tenu compte d'une distance moyenne entre ion donneur et accepteur moyenne afin de mener à bien les calculs dans un temps raisonnable.

Enfin, le dernier commentaire porte sur le calcul de E dans le cas de NPs uniques observées en microscopie (Fig. 5-B). Pour calculer l'intensité du donneur en présence de l'accepteur I_{AD} , nous avons utilisé le photoblanchiment de l'accepteur. Or ce photoblanchiment est induit à la fois par le transfert d'énergie dû au donneur et par l'absorption directe de l'accepteur. Ainsi, comme la mesure de l'intensité de l'accepteur en l'absence du donneur induit un photoblanchiment impliquant uniquement l'absorption directe de l'accepteur, on en conclut que nous sous-estimons légèrement la mesure de I_{AD} et donc de E .

4.2 Reproduction de la publication

Single Lanthanide-doped Oxide Nanoparticles as Donors in Fluorescence Resonance Energy Transfer Experiments

Didier Casanova,[†] Domitille Giaume,[‡] Thierry Gacoin,[‡] Jean-Pierre Boilot,[‡] and Antigoni Alexandrou^{*,†}

Laboratory for Optics and Biosciences, CNRS UMR7645, INSERM U696, Ecole Polytechnique, F-91128 Palaiseau Cedex, France, and Laboratory of Condensed Matter Physics, CNRS UMR7643, Ecole Polytechnique, F-91128 Palaiseau Cedex, France

Received: May 25, 2006; In Final Form: July 27, 2006

We used lanthanide-ion doped oxide nanoparticles, $\text{Y}_{0.6}\text{Eu}_{0.4}\text{VO}_4$, as donors in fluorescent resonance energy transfer (FRET) experiments. The choice of these nanoparticles allows us to combine the advantages of the lanthanide-ion emission, in particular the long lifetime and the large Stokes shift between absorption and emission, with the detectability of the nanoparticles at the single-particle level. Using cyanine 5 (Cy5) organic molecules as acceptors, we demonstrated FRET down to the single-nanoparticle level. We showed that, due to the long donor lifetime, unambiguous and precise FRET measurements can be performed in solution even in the presence of large free acceptor concentrations. Highly efficient energy transfer was obtained for a large number of acceptor molecules per donor nanoparticle. We determined FRET efficiencies as a function of Cy5 concentration which are in good agreement with a multiple acceptor–multiple donor calculation. On the basis of the donor emission recovery due to acceptor photobleaching, we demonstrated energy transfer from single-nanoparticle donors in fluorescence microscopy experiments.

Introduction

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is a powerful tool for detecting biomolecule association and dissociation processes or conformational changes. It is based on the distance-dependent energy transfer between a donor and an acceptor via nonradiative dipole–dipole interaction and requires spectral overlap between the donor emission and the acceptor absorption.¹ This energy transfer results in a decrease of donor emission, an increase of acceptor emission, as well as a decrease of donor lifetime. The efficiency of the energy transfer can be measured by a quantification of these changes and used to determine the donor–acceptor distance.

FRET using organic fluorophores as donors and acceptors has been demonstrated down to the single-pair level² and is a broadly applied technique.³ Recently, FRET experiments have been extended to nanoparticles used as donors, as in the case of quantum dots (QDs),⁴ leading to nanosensor applications^{5–8} or as multicolor emitters under single wavelength excitation in the case of silica nanoparticles containing different organic dyes.⁹

Several difficulties in FRET experiments arise due to the small Stokes shifts between absorption and emission of organic fluorophores and their broad emission spectra. To perform accurate distance measurements, it is important to discriminate against direct acceptor excitation and donor emission leaking into the acceptor emission channel. Solutions such as alternative excitation of donor and acceptor with two different excitation sources (ALEX-FRET) have been proposed to circumvent these problems.^{10,11} These cross-talk problems can be minimized in

systems with large Stokes shifts and narrow emission spectra. Along these lines, FRET (or LRET for luminescence resonance energy transfer) using lanthanide chelates^{12–14} or, more recently, quantum dots^{4–8} as donors has been demonstrated. In both these cases, the donor emission can be excited at wavelengths much shorter than the acceptor absorption thus minimizing direct acceptor excitation. Furthermore, the narrow donor emission, especially in the case of the atomic-like lanthanide emission,^{14,15} does not overlap with the acceptor emission. In addition, quantum dots are photostable, in contrast to organic donors which are subject to fast photobleaching.

Lanthanide systems used as donors provide another crucial advantage: the excited-state lifetime is very long, in the millisecond range, because the electronic transitions involved, transitions among different f-electron configurations, are forbidden; they are in fact forced electric-dipole transitions due to mixing between $4f^n$ and $4f^{n-1}5d^1$ configurations induced by the noncentrosymmetric local crystalline field.^{15,16} Thus, donor lifetime measurements are simple and precise. Furthermore, the FRET-induced acceptor emission shows the same decay behavior as the donor emission.¹⁴ Therefore, it can be easily separated from any residual emission due to direct acceptor excitation whose decay will be in the nanosecond range. This FRET-induced long acceptor lifetime is an important FRET indicator because it is insensitive to incomplete pairing and allows measurements of small signals and consequently large distances. An additional advantage of lanthanide emission is its low anisotropy which leads to smaller errors in the determination of the orientation factor κ^2 .^{14,17}

Nevertheless, the emission of a chelate incorporating a single lanthanide ion is inherently weak (at the most one photon per lifetime period can be emitted) which renders the extrapolation of lanthanide-based FRET to the single donor case delicate. On the other hand, FRET involving a single QD donor has been

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: antigoni.alexandrou@polytechnique.fr.

[†] Laboratory for Optics and Biosciences, Ecole Polytechnique.

[‡] Laboratory of Condensed Matter Physics, Ecole Polytechnique.

Single Lanthanide-doped Nanoparticles as FRET Donors

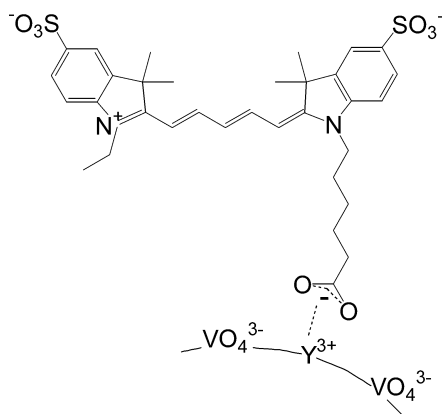


Figure 1. Schematic representation of a Cy5 molecule attached to the surface of a $Y_{0.6}Eu_{0.4}VO_4$ nanoparticle via complexation of its COO^- group to Y^{3+} (or Eu^{3+}) ions.

demonstrated,⁶ but the QD blinking behavior¹⁸ is a handicap for measurements at the single-particle level.

We here use lanthanide-doped oxide nanoparticles (NPs) as FRET donors to combine the assets related to lanthanide emission (long lifetime, large Stokes shift, narrow emission) with the capability of single-nanoparticle detection. Indeed, we have recently shown that these nanoparticles containing several thousands of lanthanide ions can be individually detected and functionalized for biomolecule labeling.¹⁹ These nanoparticles are synthesized directly in water and show no emission intermittency owing to the large number of dopant ions in each nanoparticle. Due to the size of these nanoparticles (10–40 nm), several acceptor dyes can be attached to the nanoparticle surface thus increasing the FRET efficiency, similarly to what was shown for quantum-dot donors.⁴

$Y_{0.6}Eu_{0.4}VO_4$ nanoparticles were used as donors and Cy5 (Amersham) dye molecules as acceptors. We have exploited the fact that Cy5 molecules can be attached to the nanoparticles in a straightforward manner by complexation through their COO^- groups to Y^{3+} and Eu^{3+} ions at the surface of the nanoparticles (see Figure 1). Indeed, we have shown that citrate ligands form a complexing shell around the nanoparticles via their carboxylate groups leading to higher colloidal stability and smaller sizes.²⁰ In the following, we unambiguously demonstrate FRET in solution despite the presence of high concentrations of unbound Cy5 based on changes in donor intensity and lifetime as well as on the observation of a long-lived acceptor emission. The lifetime measurements are particularly facile due to the long lifetimes involved. The extracted FRET efficiencies as a function of acceptor concentration are in good agreement with a multiple donor–multiple acceptor model. Using a wide-field microscopy setup, we demonstrated FRET at the single-nanoparticle-donor level.

Experimental Methods

Nanoparticle Synthesis. $Y_{0.6}Eu_{0.4}VO_4$ nanoparticles were synthesized as in ref 21. A solution of $Y(NO_3)_3$ (48 mL, 0.1 M) and $Eu(NO_3)_3$ (32 mL, 0.1 M) is added dropwise to a solution of Na_3VO_4 freshly dissolved in water (80 mL, 0.1 M, pH 12.9) using a peristaltic pump. The addition is stopped when the pH reaches the value of 9.1 (total addition of 60 mL). Counterions were eliminated by two centrifugations (11 400 g, 40 and 20 min) and dispersion of the precipitate in an ultrasound bath. A final purification by dialysis against pure water overnight

J. Phys. Chem. B, Vol. 110, No. 39, 2006 19265

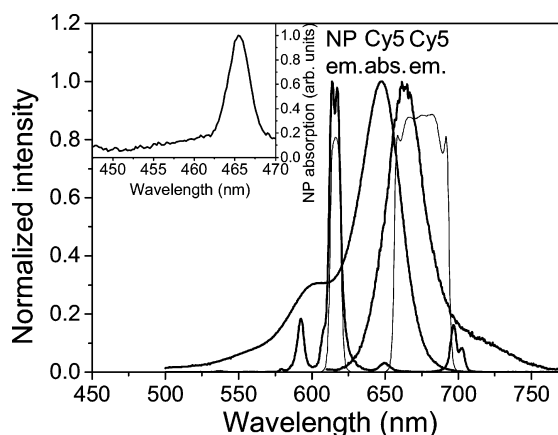


Figure 2. Emission spectrum of $Y_{0.6}Eu_{0.4}VO_4$ nanoparticles and absorption and emission spectrum of Cy5 (normalized data, thick lines) shown together with the transmission of the two filters used for the detection of the nanoparticle and Cy5 emission at 617 and 670 nm, respectively (thin lines). The inset shows the nanoparticle absorption spectrum in the range of interest here.

allows the complete elimination of the counterions (final conductivity, $86 \mu S \cdot cm^{-1}$). These bare nanoparticles, in contrast to silica-coated ones, have a weak surface charge. Therefore, sonication in an ultrasound bath is applied before use to ensure complete dispersion of the nanoparticles.

We obtained nanoparticles with an average diameter of approximately 35 nm as determined by the luminosity histogram of individual nanoparticles.²² Smaller nanoparticles with an average diameter of 17 nm were selected by retaining the supernatant after two centrifugations (11400 g, 10 min).²³ The average quantum yield q_D of the initial synthesis and of the smaller nanoparticles was equal to 0.18 and 0.07, respectively. The nanoparticle concentration is determined by dividing the concentration of vanadate (VO_4^{3-}) ions (obtained from absorption measurements at 280 nm) by the number of ions in the volume of a nanoparticle (4 vanadate ions per $(0.7 \text{ nm})^3$).

Complexation with Cy5. We added 15 μL of a Cy5 solution of various concentrations in water to 200 μL of a nanoparticle solution with a fixed vanadate concentration in an ultrasound bath. NP-Cy5 experiments were conducted after a complexation reaction time of 45 min. We took no action to remove excess Cy5 molecules. Thus, a large fraction of the Cy5 molecules is in unbound form.

Fluorescence Measurements. The 465.8-nm Ar^{+} -ion laser line exciting the $Eu^{3+} {}^7F_{0,1} \rightarrow {}^5D_2$ transition in the $Y_{0.6}Eu_{0.4}VO_4$ nanoparticles was used in most experiments.¹⁹ For the determination of the direct acceptor excitation signal, the 457.9-nm Ar^{+} -ion line was used (no nanoparticle absorption in this case; see inset of Figure 2). The intensity at 457.9 nm was adjusted to correct for the difference in the Cy5 extinction coefficient, that is, to obtain the same Cy5 signal as under 465.8-nm excitation in the absence of nanoparticles.

Lifetime Measurements. The luminescence signal was detected at room temperature (20 °C) through a long-pass filter (OG5, Schott) for excitation laser rejection and either a 617/8M (Chroma) or a 670DF40 (Omega) filter (see Figure 2 for their transmission curves) using a photomultiplier (Hamamatsu, R636-10) and a digital oscilloscope (Tektronix, TDS3052). A reference signal from a vial containing water was subtracted. The laser was focused onto a mechanical chopper with an on-time of 0.63 ms, sufficient to reach steady-state excitation

conditions for the nanoparticles, and an off-time of 1.1 ms. For detection at 617 nm, a single chopper was used. For measurements at 670 nm, the large amount of unbound Cy5 emission can saturate the detector. Therefore, we used a second chopper, synchronized to the first one, placed in front of the detector, that opens 50 μ s after switching off the laser excitation with the first chopper.

There is a small contribution of nanoparticle emission to the NP-Cy5 signal detected through the 670-nm filter due to the weak Eu^{3+} emission peak at 697 nm. The ratio between the intensities of a NP-only solution detected through the 617-nm and 670-nm filters was measured to be equal to 23.8. The NP-Cy5 signal shown in Figure 3B has therefore been corrected by subtracting the NP-Cy5 signal of Figure 3A divided by 23.8 (this correction is minor, on the order of 10%).

Microscopy Measurements. Images were recorded at room temperature (20 °C) on an inverted microscope under wide-field illumination, using an NA = 1.3 oil-immersion objective (Zeiss) and a liquid-nitrogen cooled CCD camera (Princeton Instruments LN/CCD-400-PB, 400 \times 1340 pixels, back-illuminated). Fluorescence was selected using a dichroic mirror (530DCXR, Chroma). A second 5-mm thick dichroic mirror reflects light with wavelengths above 645 nm whereas the backside reflects wavelengths in the range 560–620 nm. Thus, two images shifted by 140 20- μ m pixels are formed on the CCD. The 617- and 670-nm filters are used in front of the CCD to select light for the two images.

After a 45 min complexation time, the Cy5-coated nanoparticles were spin-coated on a silica coverslip. Rinsing of the coverslip with distilled water resulted in the removal of the free Cy5 molecules.

Calculation of the FRET Efficiency

The efficiency of energy transfer, E , is defined as the probability for the excited donor to return to its ground state by energy transfer to the acceptor

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_D} \quad (1)$$

where k_T is the rate of energy transfer to the acceptor and k_D is the total rate of all other radiative and nonradiative donor decay processes.

The FRET efficiency can be expressed in terms of R_0 , the distance at which $E = 0.5$

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (2)$$

R_0 is a function of the spectral overlap between donor emission and acceptor absorption, the donor and acceptor relative orientation, the donor quantum yield, and the index of refraction.¹⁴

Taking into account multiple acceptors at distances R_i with associated energy transfer rates k_{T_i} , eq 1 becomes

$$E = \frac{\sum_i k_{T_i}}{\sum_i k_{T_i} + k_D} \quad (3)$$

leading to

$$E = \frac{1}{1 + \frac{1}{\left(\sum_i \frac{R_0}{R_i}\right)^6}} \quad (4)$$

In our case, the above calculation has to be performed for every lanthanide (Eu^{3+} in our case) ion inside the nanoparticle. Thus, we are in a multiple donor–multiple acceptor configuration.

Since energy transfer induces a loss of donor emission intensity, the FRET efficiency can also be written as

$$E = 1 - \frac{I_{D_A}}{I_D} \quad (5)$$

where I_{D_A} (I_D) is the donor emission intensity in the presence (absence) of the acceptor. In a lanthanide-doped nanoparticle, the donor intensity corresponds to the sum of the individual lanthanide-ion emissions, $I_{D_{A_j}}$ and I_{D_j} , in the presence and the absence of the acceptor, respectively

$$E = 1 - \frac{\sum_j I_{D_{A_j}}}{\sum_j I_{D_j}} = 1 - \frac{I_{D_j} \sum_j (1 - E_j)}{N_{\text{Eu}} I_{D_j}} = \frac{\sum_j E_j}{N_{\text{Eu}}} \quad (6)$$

where N_{Eu} is the number of Eu^{3+} ions in a nanoparticle and E_j is the FRET efficiency associated with an individual lanthanide ion. Thus, the FRET efficiency for a nanoparticle corresponds to the average of all FRET efficiencies of individual lanthanide ions.

Replacing rates by lifetimes in eq 1, we obtain

$$E = 1 - \frac{\tau_{D_A}}{\tau_D} = 1 - \frac{\tau_{A_D}}{\tau_D} \quad (7)$$

where τ_D (τ_{D_A}) and τ_{A_D} are the excited-state lifetimes of the donor in the absence (presence) of the acceptor and the acceptor lifetime due to FRET excitation by the donor, respectively. The second part of eq 7 is justified as follows: in the case of a long-lived donor excited state and a short-lived organic-molecule acceptor excited state, energy transfer will take place as long as the donor remains at the excited state. Once the excitation is transferred to the acceptor, it will decay with the short acceptor characteristic time. The limiting parameter in this case is the FRET-induced appearance of excited acceptor molecules which is governed by the donor excited-state decay. Therefore, the FRET-induced acceptor emission will follow the donor decay. This long-lived acceptor emission will thus have a lifetime τ_{A_D} equal to τ_{D_A} . In contrast, the emission due to direct acceptor excitation will decay in nanoseconds.

The FRET efficiency can also be calculated from the FRET-induced acceptor emission intensity I_{A_D}

$$E = \frac{I_{A_D}/q_A}{I_{A_D}/q_A + I_{D_A}/q_D} \quad (8)$$

This equation translates the fact that the FRET efficiency is the ratio of donor excitations transferred to the acceptor to the total number of donor excitations. The emitted intensity I_{A_D} (I_{D_A}) can be converted into excited-state population density by dividing by the acceptor (donor) quantum yield, q_A (q_D).

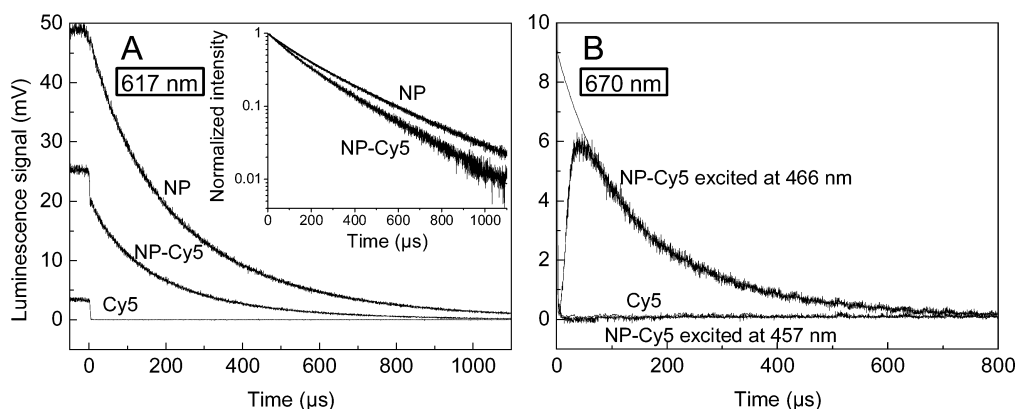


Figure 3. Decay curves measured using the 617-nm filter (A) and the 670-nm filter (B). The concentration of the 35-nm $\text{Y}_{0.6}\text{Eu}_{0.4}\text{VO}_4$ nanoparticles and Cy5 was 17 nM (4.4 mM in vanadate ions) and 70 μM , respectively. The 0 of the time scale corresponds to switching off the laser excitation. (A) $\text{Y}_{0.6}\text{Eu}_{0.4}\text{VO}_4$ nanoparticles in the absence and in the presence of Cy5 as well as Cy5 alone. The inset shows the normalized decay curves of $\text{Y}_{0.6}\text{Eu}_{0.4}\text{VO}_4$ nanoparticles in the absence and in the presence of Cy5 together with biexponential fits (due to the excellent agreement with the experiment, the fits are not distinguishable). (B) Cy5 emission in the presence and in the absence of $\text{Y}_{0.6}\text{Eu}_{0.4}\text{VO}_4$ nanoparticles after excitation at 466 nm and Cy5 emission in the presence of $\text{Y}_{0.6}\text{Eu}_{0.4}\text{VO}_4$ nanoparticles after excitation at 458 nm. A biexponential was used to fit the FRET-induced Cy5 decay after 70 μs and is extrapolated to time 0. The detection chopper opens at 50 μs .

Experimentally, detected intensities, I^{det} , are available which can be converted into emitted intensities by dividing with the detection efficiency at the donor and acceptor emission wavelength, η_D and η_A , respectively

$$E = \frac{1/q_A}{\frac{1}{q_A} + \frac{I_{D_A}^{\text{det}} \eta_A}{I_{A_D}^{\text{det}} \eta_D}} \quad (9)$$

Results and Discussion

Figure 2 shows the absorption and emission spectra of Cy5 and Eu-doped nanoparticles. We calculated the normalized spectral overlap between donor emission and acceptor absorption, J ,¹⁴ by taking into account only the $^5\text{D}_0\text{--}^7\text{F}_2$ and $^5\text{D}_0\text{--}^7\text{F}_4$ forced electric-dipole transitions centered at 617 and 697 nm, respectively. The $^5\text{D}_0\text{--}^7\text{F}_1$ and $^5\text{D}_0\text{--}^7\text{F}_3$ transitions centered at 593 and 650 nm, respectively, are magnetic dipole transitions^{16,24} and do not contribute to FRET. Using the average index of refraction of YVO_4 $n = 2.0704$ at 617 nm, an orientation parameter $\kappa^2 = 2/3$ assuming random orientation of the donor and acceptor transition dipoles, and the quantum efficiency of the nanoparticles $q_D = 0.18$ (0.07 for the smaller nanoparticles), we obtained $R_0 = 41.9 \text{ \AA}$ (35.8 \AA for the smaller nanoparticles).

Ensemble FRET Measurements. We used the narrow 466-nm Eu^{3+} absorption line to excite the 35-nm nanoparticles and recorded the fluorescence decay of a NP, a NP-Cy5, and a Cy5 solution at the donor (Figure 3A) and at the acceptor emission wavelength (Figure 3B) using two different filters centered at 617 and 670 nm, respectively (see Figure 2). In the presence of Cy5, both the nanoparticle emission intensity and decay time are reduced indicating the presence of energy transfer to Cy5 (see Figure 3A). In addition, a small abrupt decrease (faster than our time resolution) is observed right after the laser excitation is switched off. This abrupt decrease is due to a small fraction of the Cy5 emission centered at 663 nm leaking through the 617-nm filter (see Figure 2). The Cy5-only control solution shows the same abrupt drop and thus confirms this interpretation. We can calculate the FRET efficiency using eq 5: $E = 1 - 19.9/48.5 = 0.59$ where I_{D_A} was taken equal to the intensity after the initial fast drop.

The NP-only emission after 40 μs can be fitted to the equation: $y = 42\% \exp(-t/130 \mu\text{s}) + 58\% \exp(-t/331 \mu\text{s})$. The two different lifetimes can be explained as follows: the energy of the $^5\text{D}_0\text{--}^7\text{F}_6$ Eu^{3+} transition nearly corresponds to the third harmonic of the OH vibrational mode in water molecules. This is a well-known nonradiative decay processes for Eu^{3+} ions and has been demonstrated in our colloidal nanoparticles.²⁴ Obviously, the Eu^{3+} ions close to the surface of the nanoparticle will be more affected by this nonradiative channel thus leading to shorter excited-state lifetimes. The NP emission in the presence of Cy5 after 40 μs can be fitted to the following: $y = 40\% \exp(-t/100 \mu\text{s}) + 60\% \exp(-t/260 \mu\text{s})$. Both the short and the long lifetime of the NP emission are reduced in the presence of Cy5. Using eq 7 and the average lifetimes²⁵ in the presence and absence of Cy5, we can calculate the FRET efficiency: $E = 1 - 159/201 = 0.21$.

The apparent discrepancy between the FRET efficiency calculated using the emission intensities and the lifetimes is explained as follows: the Eu ions close to the surface of the nanoparticles can be located at very small distances from a Cy5 molecule. For these ions, the FRET efficiency will be practically 1, the intensity emitted by them will be negligible, and the lifetimes of the small remaining fraction of emitted intensity will be extremely short. The decay curve of the nanoparticle emission will therefore show little trace of this contribution and will be dominated by the Eu ions closer to the center of the nanoparticles where individual-ion FRET efficiencies E_i are lower. The ratio of the nanoparticle emission intensity in the presence and the absence of acceptor (eq 5), on the other hand, takes into account contributions from ions both at the surface and in the volume of the nanoparticles and gives a more accurate determination of the FRET efficiency. This interpretation is confirmed by the simulations discussed below.

Let us now turn to the emission of Cy5 at 670 nm (Figure 3B). In the absence of FRET, the decay time of the Cy5 emission is in the nanosecond range. In contrast, the Cy5 emission due to energy transfer from the nanoparticles will follow the decay time of the NP emission and will thus be in the millisecond range. This is indeed what is observed in Figure 3B (NP-Cy5 curve) and is irrefutable evidence that FRET takes place. The temporal discrimination of FRET-induced Cy5 emission is a

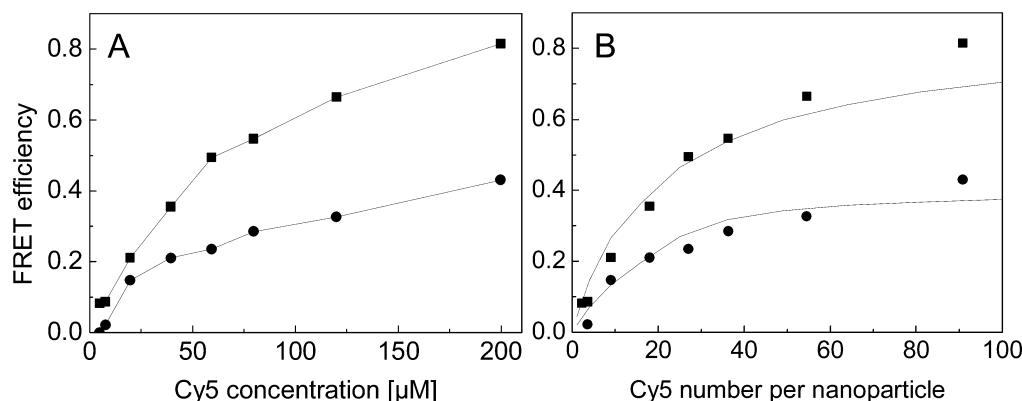


Figure 4. (A) Experimental data: FRET efficiency as a function of Cy5 concentration estimated from the nanoparticle emission intensity in the presence and absence of Cy5 (eq 5, squares) or from the nanoparticle emission lifetime in the presence and absence of Cy5 (eq 7, circles). The 17-nm nanoparticle concentration was $0.12 \mu\text{M}$ (3.6 mM in vanadate ions). The second approach underestimates the FRET efficiency. The lines are a guide to the eye. (B) Theoretical FRET efficiency as a function of the number of Cy5 molecules per nanoparticle calculated using the nanoparticle emission intensity or the nanoparticle emission lifetime (solid lines). The experimental data of (A) are superimposed (see text).

powerful tool because it allows measurements free from direct acceptor excitation signal (which is short-lived) and independent of acceptor-only concentrations. As a further control, we recorded the fluorescence of a Cy5-only solution as well as the signal of a NP-Cy5 solution excited at 458 nm where there is no nanoparticle absorption (see inset of Figure 2) and thus no FRET. In both these cases, no long-lived signal was observed.

The decay time of the FRET-induced Cy5 emission for times longer than $70 \mu\text{s}$ was fitted with the biexponential: $y = 58\% \exp(-t/96 \mu\text{s}) + 42\% \exp(-t/252 \mu\text{s})$. As discussed above, the FRET efficiency calculated from the average acceptor lifetime,²⁵ $\tau_{\text{AD}} = 130 \mu\text{s}$, using eq 7 is underestimated because the short lifetime contributions due to Eu^{3+} ions close to the nanoparticle surface are cut off by the rejection of the first $50 \mu\text{s}$ by the second chopper in front of the detector. For the same reasons, the FRET efficiency calculated using eq 9 is underestimated. Indeed, by extrapolating to time 0 the fit to the decay curve for times longer than $70 \mu\text{s}$, we find $I_{\text{AD}} = 9.1$ and $E = 0.17$, where we have used $q_{\text{D}} = 0.18$ and $q_{\text{A}} = 0.28$ and $\eta_{\text{A}}/\eta_{\text{D}} = 1.42$.

Comparison with Simulations. We then repeated the above experiments as a function of the total Cy5 concentration using nanoparticles with an average diameter of 17 nm .²³ The FRET efficiencies obtained using the donor intensities and lifetimes are shown in Figure 4A. We again find that the determination based on the donor lifetimes underestimates the FRET efficiency. Quite high transfer efficiencies ($E > 0.8$) are observed for large Cy5 concentrations.

To compare our experiments to simulations, we considered ellipsoidal nanoparticles with a homogeneous distribution of Eu ions and a homogeneous distribution of a varying number of Cy5 molecules on their surface.²⁶ We then calculated for each Eu ion, j , its distance to the different Cy5 molecules, R_j , the associated FRET efficiency, E_j , using eq 4 and subsequent emission intensity, $I_{\text{DA},j}$, and lifetime, $\tau_{\text{DA},j}$, using eqs 5 and 7, respectively, where τ_{D} was taken to be equal to the average experimental lifetime ($208.4 \mu\text{s}$). The individual decay curves were then summed to give the nanoparticle decay curve whose value at $t = 0$ gives I_{DA} . The NP lifetime curves consist of a fast decaying part due to Eu ions close to the surface followed by a slower decay due to Eu ions in the volume of the nanoparticle. To better approach the experimental conditions, the decay curves were fitted to biexponentials between 40 and $1100 \mu\text{s}$, the average lifetime giving τ_{DA} . The FRET efficiencies

TABLE 1: FRET Efficiency, E , Obtained from the Nanoparticle Emission Intensity Change and Nanoparticle Average Lifetime Values, $\langle\tau_{\text{DA}}\rangle$ ²⁵

| total Cy5/NP concentration ratio | bound Cy5 molecules per NP | NP size (nm) | $\langle\tau_{\text{DA}}\rangle (\mu\text{s})$ | E |
|----------------------------------|----------------------------|--------------|--|------|
| 4118 | | 35 | 159 | 0.59 |
| 1665 | 91 | 17 | 119 | 0.81 |
| 1000 | 55 | 17 | 140 | 0.66 |
| 665 | 36 | 17 | 149 | 0.55 |
| 495 | 27 | 17 | 159 | 0.49 |
| 330 | 18 | 17 | 165 | 0.35 |
| 165 | 9 | 17 | 178 | 0.21 |
| 65 | 4 | 17 | 204 | 0.09 |
| 42 | 2 | 17 | 208 | 0.08 |

^a The error bar is approximately 10%. The lifetime of the 35 (17) nm nanoparticles in the absence of acceptors was 201 (208.4) μs . The numbers of bound Cy5 molecules per nanoparticle were determined from the comparison between the experimental data and the simulations (see Figure 4).

obtained from these theoretical I_{DA} and τ_{DA} values are shown in Figure 4B. As expected, the FRET efficiency determined from the donor lifetime is underestimated.

The x-axis in Figure 4A (Cy5 concentration) can be translated into the number of Cy5 molecules per nanoparticle by dividing with the NP concentration ($0.12 \mu\text{M}$). The ratio of total to bound Cy5 molecules is determined by the complexation reaction equilibrium constant K

$$K = \frac{[\text{Y}^{3+} - \text{Cy5}]}{[\text{Y}^{3+}][\text{Cy5}]} \quad (10)$$

where $[\text{Y}^{3+}]$ stands for the total Y^{3+} and Eu^{3+} concentration. Very good agreement between the experimental and theoretical data can be obtained by assuming a ratio of total to bound Cy5 molecules equal to 18.3 (see Figure 4B). The FRET efficiencies and lifetime values obtained for the various Cy5/nanoparticle ratios are recapitulated in Table 1. On the basis of the total Y^{3+} and Eu^{3+} concentration at the surface of the 17-nm nanoparticles (estimated to be equal to $445 \mu\text{M}$), this ratio implies $K = 130 \text{ M}^{-1}$. This value should be considered as an estimate of the order of magnitude due to uncertainties in nanoparticle size and concentration and due to the fact that the Y^{3+} and Eu^{3+} ions interacting with Cy5 molecules are concentrated on the nanoparticle surfaces and do not diffuse independently.

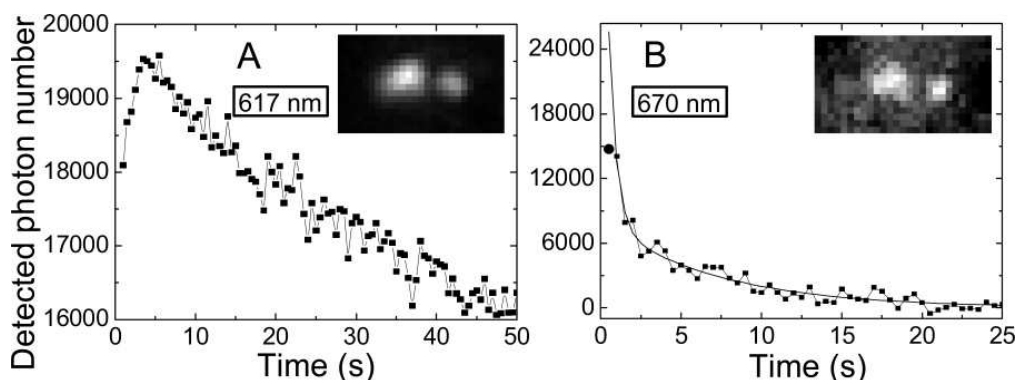


Figure 5. Detected photons per image through (A) the 617-nm filter and (B) the 670-nm filter as a function of prior illumination time for a single Cy5-coated nanoparticle spin-coated on a silica coverslip observed using wide-field dual-color fluorescence microscopy (squares and solid lines as a guide to the eye; excitation wavelength, 466 nm; intensity at the sample, 2 kW/cm²; integration time, 500 ms). The concentration of the 35-nm nanoparticles and Cy5 used in the complexation reaction was 4.2 nM (1.1 mM in vanadate ions) and 18 μ M, respectively. In (B), the solid line is a biexponential fit to the Cy5 emission decay; the circle corresponds to a first image taken under 458-nm excitation. The insets are images showing Cy5-coated nanoparticles and correspond to the first 466-nm illumination. The Cy5-coated nanoparticle on the right was used to obtain the detected photon numbers shown here.

Single-donor FRET Experiments. We also demonstrated energy transfer on the single-donor level. For this purpose, we used an inverted microscope setup to observe 35-nm nanoparticles deposited by spin-coating on a silica coverslip after complexation with Cy5. We have previously shown that these lanthanide-doped nanoparticles are observable on the single-particle level¹⁹ after spin-coating on a coverslip at suitable dilution levels. The detection of single nanoparticles is confirmed by a comparison between the measured and calculated number of detected photons per second.^{19,22} In the present case, we performed dual-color imaging (through the 617- and the 670-nm filter) to simultaneously image light emitted by the nanoparticles and by Cy5. We first checked, by imaging a nanoparticle-only coverslip, that the bright spots due to single nanoparticles in the 617-nm image (see ref 19) gave rise to no signal in the 670-nm image. Similarly, the Cy5 emission leak in the 617-nm image was negligible.

In the case of Cy5-coated nanoparticles, emission in both the 617- and the 670-nm image was observed (see insets of Figure 5). To determine which part of the Cy5 emission at 670 nm is due to direct excitation, we recorded a single image under 458-nm excitation (no excitation of the nanoparticles and thus no FRET) followed by a series of images under 466-nm excitation. Figures 5A and B show the number of photons detected for the bright spot on the right in the insets at 617 and 670 nm, respectively, as a function of prior illumination time. The Cy5 signal (Figure 5B) photobleaches almost completely within 5 s. The nanoparticle signal (Figure 5A), on the contrary, shows an increase concomitant with the Cy5 photobleaching. This increase is then followed by a slow decrease which is the behavior normally observed for single nanoparticles in the absence of Cy5 (see Figure 1F of ref 19). Note that only the usual slow decrease of the nanoparticle emission was observed for nanoparticles without Cy5 (showing no signal in the 670-nm image). The nanoparticle emission increase concomitant with the Cy5 emission decrease is clear evidence of energy transfer taking place between the single nanoparticle and Cy5 molecules at its surface. As the Cy5 molecules photobleach, the energy loss channel due to FRET disappears and the nanoparticle emission increases.

To determine the FRET efficiency, we subtracted the Cy5 signal measured under 458-nm excitation (direct acceptor excitation) from the Cy5 signal under 466-nm excitation (direct

excitation + FRET signal) to obtain I_{AD} . The Cy5 signal under 466-nm excitation was determined by fitting the decay curve as a function of illumination time to a biexponential and by extrapolating to the value corresponding to the first illumination sequence. I_{DA} was taken equal to the value corresponding to the first image under 466-nm excitation. Using eq 9, we obtained $E = 0.24$ for the nanoparticle on the right in the inset of Figure 5 and $E = 0.17$ (standard deviation, 0.07) as an average over 13 nanoparticles. This FRET efficiency is weaker than that expected from ensemble measurements for the same relative nanoparticle and Cy5 concentrations ($E = 0.59$). There are two explanations for this difference: (i) Part of the Cy5 molecules at the surface of the nanoparticles are removed during the rinsing of the coverslip (see Experimental Methods section) since the complexation is a reversible process. (ii) The I_{DA} value is slightly overestimated because it corresponds to the second (instead of the first) illumination sequence and some Cy5 photobleaching has already taken place.

Conclusions

We have shown that lanthanide-doped nanoparticles are very promising as donors in FRET experiments. Indeed, the long lifetime, the large Stokes shift, and the narrow emission of these nanoparticles render FRET experiments particularly straightforward and feasible even in the presence of large amounts of unbound acceptor. The nanosecond acceptor emission due to direct acceptor excitation can be easily distinguished from the much longer-lived sub-millisecond FRET-induced acceptor fluorescence. A large number of acceptor (Cy5) molecules can be bound to the nanoparticles, and for large Cy5 concentrations, FRET efficiencies larger than 0.8 have been obtained. A comparison with simulations demonstrates that, in this multiple donor–multiple acceptor configuration with a whole range of donor–acceptor distances, the most reliable estimation of FRET efficiency is the one based on the donor intensity in the presence and absence of acceptor. The combination of the advantages of lanthanide-ion luminescence and the presence of a large number of lanthanide ions in nanometer-sized particles allowed the observation of energy transfer from a single nanoparticle donor.

We expect energy transfer to a single acceptor per nanoparticle to be detectable for smaller nanoparticles (5–10 nm) in ensemble measurements. Currently, $Y_{0.6}Eu_{0.4}VO_4$ nanoparticles

19270 *J. Phys. Chem. B*, Vol. 110, No. 39, 2006

Casanova et al.

excited through a Eu^{3+} absorption line are individually detectable for sizes down to 15 nm.²² To achieve single-pair energy transfer, excitation of the nanoparticles in the UV exploiting the much higher absorption coefficient of the oxide matrix should be used.

Ensemble FRET measurements using these nanoparticles as donors can be used to measure protein–protein, protein–DNA, or oligonucleotide interaction processes. We have recently functionalized these lanthanide-doped nanoparticles with amine groups. They can then be attached to the amine group of a biomolecule using a homobifunctional cross-linker (formation of peptide bonds between the nanoparticle and the linker and between the linker and the biomolecule).²⁷ Thus, binding of a protein to lanthanide nanoparticles should allow us to determine its interaction network with other proteins labeled with the acceptor fluorophore. Furthermore, nanoparticles conjugated to specific recognition molecules such as receptors, can be quenched by using acceptor-labeled ligand analogues and used as nanosensors detecting the replacement of the analogue by the ligand via the disappearance of FRET, similarly to what was proposed for FRET-based TNT QD sensors.³ For very small analyte amounts, as in the case of signaling molecules liberated by cells, the capability of detection on the single-donor level may be essential. More generally, all types of FRET applications could profit from the features of these nanoparticle donors: straightforward lifetime measurements, experiments exempt from necessity of free acceptor removal as well as from donor photobleaching and blinking problems.

Acknowledgment. We thank Manuel Joffre for a useful discussion and the DGA (Délégation Générale pour l'Armement) and the Fonds National pour la Science (AC Dynamique et Réactivité des Assemblages Biologiques) for financial support.

References and Notes

- (1) Förster, T. In *Modern Quantum Chemistry*; Sinanoglou, O., Ed.; Academic: New York, 1965; p 93.
- (2) Ha, T.; Enderle, T.; Ogletree, D. F.; Chemla, D. S.; Selvin, P. R.; Weiss, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 6264.
- (3) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Academic: New York, 1999.
- (4) Clapp, A. R.; Medintz, I. L.; Mauro, J. M.; Fisher, B. R.; Bawendi, M. G.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 301.
- (5) Goldman, E. R.; Medintz, I. L.; Whitley, J. L.; Hayhurst, A.; Clapp, A. R.; Uyeda, H. T.; Deschamps, J. R.; Lassman, M. E.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6744.
- (6) Zhang, C.-Y.; Yeh, H.-C.; Kuroki, M. T.; Wang, T.-H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 826.
- (7) Chang, E.; Miller, J. S.; Sun, J. T.; Yu, W. W.; Colvin, V. L.; Drezek, R.; West, J. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1317.
- (8) Medintz, I. L.; Clapp, A. R.; Brunel, F. M.; Tiefenbrunn, T.; Uyeda, T.; Chang, E. L.; Deschamps, J. R.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 581.
- (9) Wang, L.; Tan, W. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 84.
- (10) Kapanidis, A.; Lee, N. K.; Laurence, T. A.; Dooze, S.; Margeat, E.; Weiss, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8936.
- (11) Lee, N. K.; Kapanidis, A.; Wang, Y.; Michalet, X.; Mukhopadhyay, J.; Ebricht, R. H.; Weiss, S. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2939.
- (12) Selvin, P. R.; Rana, T. M.; Hearst, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6029.
- (13) Selvin, P. R.; Hearst, J. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 10024.
- (14) Selvin, P. R. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, *31*, 275.
- (15) Blasse, G.; Grabmeier, B. C. *Luminescent Materials*; Springer-Verlag: Berlin, 1994.
- (16) Carnall, W. T.; Goodman, G. L.; Rajnak, K.; Rana, R. S. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 3443.
- (17) Reifenger, J. G.; Snyder, G. E.; Baym, G.; Selvin, P. R. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12862.
- (18) Brokmann, X.; Hermier, J.-P.; Desbiolles, P.; Bouchaud, J.-P.; Dahan, M. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 120601.
- (19) Beaupaire, E.; Buisette, V.; Sauviat, M.-P.; Giaume, D.; Lahil, K.; Mercuri, A.; Casanova, D.; Huignard, A.; Martin, J.-L.; Gacoin, T.; Boilot, J.-P.; Alexandrou, A. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2079.
- (20) Huignard, A.; Buisette, V.; Laurent, G.; Gacoin, T.; Boilot, J.-P. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2264.
- (21) Huignard, A.; Gacoin, T.; Boilot, J.-P. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1090.
- (22) Casanova, D.; Giaume, D.; Beaupaire, E.; Gacoin, T.; Boilot, J.-P.; Alexandrou, A. Unpublished results.
- (23) The mean size of the nanoparticles was obtained from TEM images which show ellipsoids with mean values for 603 nanoparticles of the long (short) axis equal to 22.2 (12.7) nm and standard deviations equal to 10.7 and 5.6 nm, respectively. The diameter of a circle of equal surface is 16.7 nm.
- (24) Huignard, A.; Buisette, V.; Franville, A.-C.; Gacoin, T.; Boilot, J.-P. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6754.
- (25) The inverse average lifetime is taken equal to the weighted mean of the inverse times used for the biexponential fit.
- (26) The axis lengths of the ellipsoids were taken equal to the mean values determined from the TEM images, 22.2 and 12.7 nm. The third axis length was taken equal to the mean value determined from the other two (16.7 nm).
- (27) Casanova, D.; Giaume, D.; Martin, J.-L.; Gacoin, T.; Boilot, J.-P.; Alexandrou, A. Unpublished results.

Chapitre 5

Fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde

5.1 Etat de l'art

En biologie, les groupes fonctionnels réactifs sont principalement les amines primaires, les acides carboxyliques, les alcools et les thiols. Ainsi, afin de coupler un fluorophore à une biomolécule, le fluorophore doit être modifié pour être réactif vis-à-vis de ces groupes fonctionnels.

Le développement de centaines de fluorophores organiques comme marqueurs en biologie se base en effet sur la possibilité de modifier un groupe chimique sur une molécule organique. De nombreux fluorophores sont proposés commercialement sous leur forme acide activée, comme par exemple le succinimidylester, thiocyanate ou encore maléimide, permettant de former des liaisons avec les amines et les thiols.

Dans le cas de sondes inorganiques, c'est alors la surface qui doit être réactive vis-à-vis d'un groupe fonctionnel. Cette surface ne présentant pas une réactivité contrôlée, il est nécessaire de lui apporter une fonctionnalité particulière en la modifiant. L'introduction d'une fonction en surface des particules peut se faire suivant différentes approches que nous allons décrire.

5.1.1 Présentation des molécules de fonctionnalisation

Une première stratégie de fonctionnalisation consiste à utiliser des molécules bifonctionnelles réactives d'une part avec la surface des NPs et d'autre part avec la biomolécule visée.

Molécules bifonctionnelles simples

Cette fonctionnalisation a été largement développée sur des NPs semiconductrices de type CdSe recouvertes d'une couche de ZnS synthétisées en milieu coordinant organique TOP ou TOPO (TriOctylPhosphine, TriOctylPhosphineOxide).^[10;62] Du fait de la nature de la couche superficielle ZnS, ces NPs présentent une affinité particulière avec les thiols. Des NPs fonctionnalisées par des fonctions acide carboxyliques ont pu être ainsi obtenues par complexation de la surface des NPs par des acides mercaptocarboxyliques.^[63] De plus, des ligands phosphines remplaçant les molécules de solvant peuvent être utilisés. Cette méthode a également été retenue pour la fonctionnalisation de la surface de NPs métalliques pouvant ainsi être complexée par des amines,^[64;65] des citrates,^[66] ou des thiols.^[67;68]

De même, Meiser et al.^[69] utilisent l'acide 6-aminohexanoïque pour fonctionnaliser la surface de NPs de phosphate de lanthane avec une fonction acide, par simple complexation de l'amine sur la surface des particules.

Molécules polydentales fonctionnalisées

Certaines équipes ont développé des molécules polydentales portant la fonction souhaitée menant à des fonctionnalisations de surface compétitives et durables dans le temps. Ainsi, l'équipe de Bawendi a développé la chimie des phosphines polymériques avec un certain succès,^[70] permettant de fonctionnaliser des NPs semi-conductrices, métalliques ou d'oxydes. Des ligands thiolés polydentales ont également été développés.^[71]

Dendrons fonctionnalisés

En poussant l'idée plus loin, d'autres équipes comme celle de Peng ont alors synthétisé des dendrimères branchés de plus en plus complexes,^[72] et polymérisés,^[73] afin d'éviter la décomplexation en surface. En effet, en polymérisant la partie externe des dendrimères, une " boîte dendrimérique " entourant la particule est créée, et assure ainsi une modification de la surface irréversible.

5.1.2 Nature du couplage entre molécules bifonctionnelles et surface des NPs

Trois natures différentes de couplage vont être présentées dans cette section.

Complexation

Nous avons vu dans la section précédente qu'une des méthodes de choix pour réaliser le couplage entre NPs et molécules bifonctionnelles servant de lien entre NPs et biomolécules est la complexation. Cependant, les liaisons mises en jeu lors de ces fonctionnalisations sont généralement des liaisons de coordination. La conséquence est que, sous certaines conditions, l'équilibre de complexation peut être déplacé, menant à la dégradation de la fonctionnalisation de surface.^[70] L'utilisation des molécules polydentales et des dendrons a été précisément choisie pour assurer une fonctionnalisation perenne.

Liaisons hydrophobes

La synthèse des NPs se fait souvent en milieu organique, en présence de ligands hydrophobes. Le transfert des particules hydrophobes d'un milieu organique à un milieu aqueux doit alors être réalisé pour une utilisation en biologie. Ce transfert peut être assuré par le surfactant CTAB, largement utilisé,^[74] ainsi que par la cyclodextrine, présentant une cavité hydrophobe et une surface extérieure hydrophile.^[75] L'ajout d'une molécule amphiphile présentant sur sa partie hydrophile la fonction désirée va alors permettre de fonctionnaliser la surface des particules. Ainsi, l'encapsulation par des micelles fonctionnalisées, développée par Dubertret,^[76] connaît un engouement assez important.

Réticulation polymérique

Une autre méthode de fonctionnalisation consiste à créer autour de la NP une couche polymérique. Cette couche, outre sa fonction de fonctionnalisation, peut également assurer une fonction de protection de la surface des NPs, ou encore empêcher des interactions non-spécifiques avec les entités biologiques.

Ces molécules polymériques sont souvent organiques, comme le polymère Dextran, utilisé pour des applications en imagerie médicale ou en cytométrie nécessitant une inertie totale de la sonde envers son environnement.^[77]

La protection de la surface des NPs ainsi que sa fonctionnalisation peut également être assurée par un enrobage des NPs par un réseau polymérique inorganique d'alcoxysilanes. En effet, la chimie des alcoxysilanes, très variée, offre au système une liberté quant à la fonctionnalité de surface à apporter.

L'enrobage des NPs par des alcoxysilanes a été largement étudié sur des NPs semi-conductrices,^[78] métalliques^[79] et oxydes.^[80;81] Alivisatos et al.^[82] ont par exemple développé la fonctionnalisation des NPs semi-conductrices par des alcoxysilanes, donnant des fonctionnalités variées à la surface.

Cette voie de fonctionnalisation, qui a également été développée sur des NPs d'oxydes,^[80;81] a semblé être la méthode la plus simple à mettre en place pour fonctionnaliser nos NPs de vanadate d'yttrium, permettant une chimie de post-fonctionnalisation très variée.

Le lecteur peut retrouver cette introduction sous une forme plus étoffée dans la thèse de Domitille Giaume effectuée au LPMC et soutenue en 2006.^[18] Deux articles de revue réalisés par l'équipe de Hedi Mattoussi et celle de Shimon Weiss proposent, de plus, un tour d'horizon des différentes stratégies de fonctionnalisation des QDs.^[11;12]

Durant les thèses de Arnaud Huignard^[37] et Domitille Giaume^[18], l'équipe du LPMC s'est attaché, notamment, à synthétiser des NPs d'oxyde entourées d'une couche polymérique de silice puis à modifier la surface externe de cette couche de silice afin qu'elle présente des groupements réactifs. Un important travail de caractérisation de cette couche de silice fonctionnalisée a été réalisé par Domitille Giaume. Nous avons souhaité présenter dans ce manuscrit les résultats obtenus au LPMC afin que le lecteur puisse embrasser sous une forme continue l'ensemble du processus de fonctionnalisation et de couplage aux protéines. Les NPs fonctionnalisées sont le point de départ du travail réalisé au LOB portant sur le couplage des NPs aux protéines et sur la détermination du nombre de protéines accrochées aux NPs.

5.2 Enrobage des NPs par une couche polymérique de silice fonctionnalisée

Cette section est en grande partie extraite de la thèse de Domitille Giaume.^[18] Les groupements chimiques époxy et amine ont été choisis comme groupements fonctionnels. Le choix de ces deux fonctions a été motivé par la versatilité des réactions pouvant ensuite être envisagées lors du couplage avec les protéines. Pour greffer ces deux fonctions en surface des NPs, l'approche consistant à enrober les NPs dans un réseau polymérique fonctionnalisé d'alcoxysilanes condensés a été choisie.

Cette approche s'appuie sur le principe suivant : des alcoxysilanes, de formule générale

$Si(OR)_xR'_{4-x}$ sont utilisés comme précurseurs de silice. Selon le nombre n de groupements OR , ils sont appelés monoalcoxysilanes ($x = 1$), bialcoxysilanes ($x = 2$), trialcoxysilanes ($x = 3$) ou tétraalcoxysilanes ($x = 4$). Les groupes alcoxy OR peuvent s'hydrolyser en silanols $SiOH$, puis se condenser en formant des ponts siloxanes $SiOSi$, comme montré sur la figure suivante.

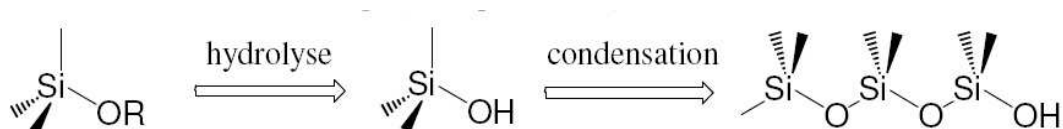


FIG. 5.1 – Schéma d'hydrolyse et condensation des alcoxysilanes.

La présence d'un ou plusieurs groupes alkyles R liés au silicium pouvant porter les fonctions amines ou époxy permet d'apporter la fonctionnalité au réseau polymérique. La formation autour des NPs d'un réseau polymérique fonctionnalisé d'alcoxysilanes peut être envisagée de différentes manières.

Deux méthodes de fonctionnalisation des NPs ont été étudiées :

- une première approche consiste à traiter en deux temps la formation d'un réseau polymérique d'alcoxysilanes et la fonctionnalisation de la surface. La formation d'un réseau polymérique d'alcoxysilanes non fonctionnalisé (donc de silice) se fait par l'utilisation de tétraalcoxysilanes $Si(OR)_4$. Afin de fonctionnaliser ensuite la surface, des monoalcoxysilanes de type $Si(OR)Me_2R''$ sont utilisés (Me pour méthyl), où la fonction amine ou epoxy est apportée par le groupement R'' .
- une seconde approche consiste à former autour des NPs un réseau polymérique de polysiloxanes fonctionnalisés en volume. Ceci peut être réalisé en utilisant des trialcoxysilanes $Si(OR)_3R'$, la fonction amine ou époxy étant portée par le groupe R' . Dans ce cas on utilise une couche de silice formée par complexation de silicates qui sert d'amorce à la couche de fonctionnalisation.

Nous allons présenter dans la suite les principaux résultats obtenus par ces deux approches de fonctionnalisation. Nous nous concentrerons essentiellement sur la fonctionnalisation de la surface des NPs par greffage de fonctions amines (Cf. référence^[18] pour greffage de fonctions epoxy).

5.2.1 Enrobage par de la silice fonctionnalisée en deux étapes

L'approche qui sera développée dans cette partie est la formation d'une couche de silice sur des NPs à partir de tétraalcoxysilanes par voie sol-gel. Le choix s'est porté sur le tétrapropoxysilane, qui s'hydrolyse moins vite que le tétraéthoxysilane, couramment utilisé.

Une fonctionnalisation a ensuite été réalisée par condensation d'aminopropyldiméthyléthoxysilanes, suivant le même mode opératoire. Cette approche peut être schématisée selon la Fig. 5.2.

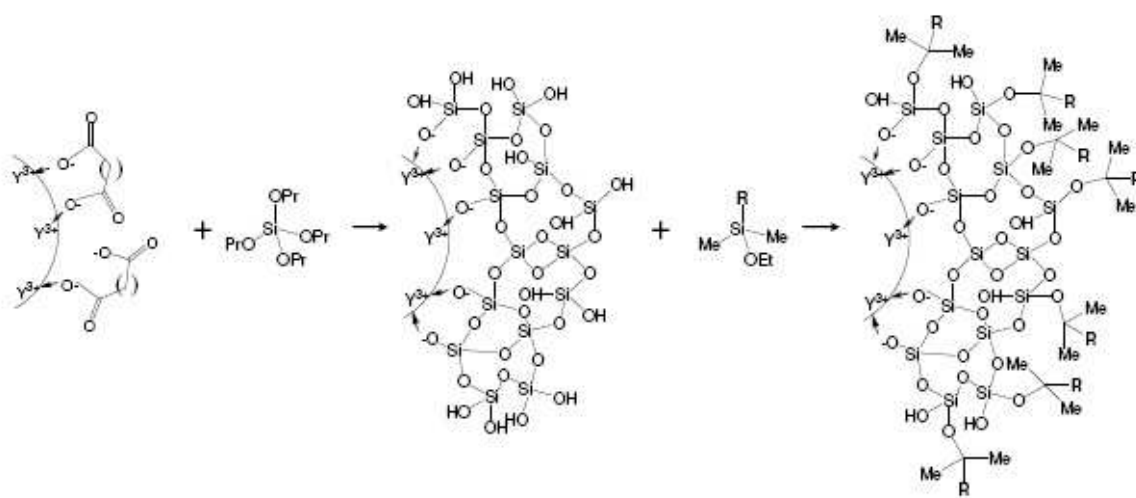


FIG. 5.2 – Schéma de la formation d'une couche de silice fonctionnalisée sur les NPs de $Y_{1-x}Eu_xVO_4$ stabilisées avec du citrate en deux étapes : la formation d'une couche de silice, puis la formation d'une couche d'alcoxysilane fonctionnalisé.

Formation de la couche de silice

Stöber, Fink et Bohn ont décrit les premiers la synthèse sol-gel de NPs de silice dans un milieu alcoolique à partir de tétraalcoxysilanes en présence contrôlée d'ammoniaque et d'eau.^[83] Cette voie de synthèse a ensuite fait l'objet de nombreuses études, tant expérimentales que théoriques. L'équipe du LPMC a alors adapté et optimisé le protocole de Stöber aux cas des NPs d'oxyde.^[18]

L'enrobage des NPs par des tétraalcoxysilanes a été caractérisé par l'épaisseur de la couche déposée. Cette épaisseur a pu être suivie au cours du processus de polymérisation par diffusion dynamique de la lumière et par microscopie électronique en transmission.

La formation lente d'une couche de silice autour des NPs d'une épaisseur de 10 ± 1 nm a été

observée. Cette épaisseur est légèrement inférieure à l'épaisseur de 12 nm calculée d'après les résultats de l'analyse élémentaire. Il a été montré que 67 à 100% du tétrapropoxysilane initialement introduit se dépose en surface des particules. La vitesse de dépôt des tétrapropoxysilanes est relativement lente, de $1.9 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$, ce qui favorise le dépôt des tétraalcoxysilanes en surface des NPs, et inhibe ainsi la formation de germes secondaires, *i.e.* de germes ne contenant pas de NPs.

Les objets en fin de réaction sont bien séparés et peuvent être schématisés de la manière suivante : une NP ovoïde de 33 nm sur 19 nm, recouverte d'une coquille de silice de 10 nm.

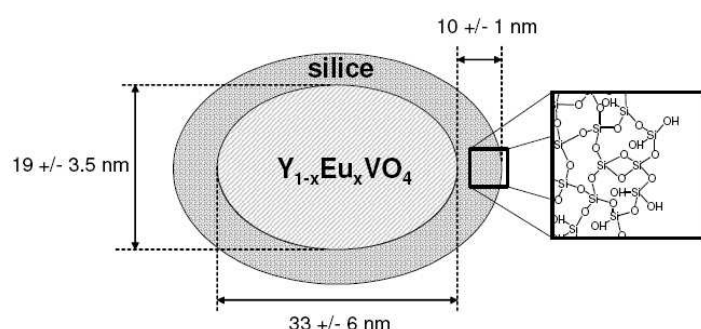


FIG. 5.3 – Schéma de l'encapsulation des NPs par des tétrapropoxysilanes.

Cependant, cette méthode de fonctionnalisation engendre une augmentation importante de la taille des objets, de l'ordre de 20 nm. Deux approches ont alors été utilisées pour réduire l'épaisseur de cette couche. La première consiste à stopper la réaction avant son terme par purification mais a entraîné l'aggrégation des objets pendant cette purification. La seconde consiste à varier les rapports de concentration en tétrapropoxysilane et NPs mais n'a pas permis un contrôle de l'épaisseur de la couche de silice déposée sur les NPs. Cette augmentation de la taille des NPs peut apparaître comme une limite pour l'utilisation d'une telle voie de fonctionnalisation.

Fonctionnalisation de la couche de silice

La fonctionnalisation de la surface des NPs enrobées d'une couche épaisse de silice a été réalisée par condensation de monoalcoxysilanes sur la surface dans un milieu alcoolique en présence contrôlée d'eau et d'ammoniaque. L'analyse élémentaire indique une densité de fonctions amines de 1.7 à 2.1 amines par nm^2 .

Ce résultat est corroboré par des mesures de résonance magnétique nucléaire (RMN). La Résonance Magnétique Nucléaire est une méthode permettant d'analyser un échantillon li-

quide ou solide contenant des éléments présentant un spin nucléaire non nul. Lorsque l'on travaille avec des échantillons solides, certaines interactions entre spins ne peuvent pas être moyennées, ce qui mène à un élargissement des pics de RMN. Afin de limiter cet élargissement, il faut moyenner ces interactions en faisant tourner l'échantillon à 54.7° , angle appelé Angle Magique (RMN MAS). La spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire permet la caractérisation d'échantillons contenant du silicium. En effet, le silicium a un isotope de spin nucléaire $\frac{1}{2}$ en proportion naturelle de 4.7%, pouvant être détecté par RMN. L'environnement de chaque silicium, et notamment ses premiers et seconds voisins, modifie son déplacement chimique, donné en ppm (partie par million). Ainsi, la RMN MAS ^{29}Si a permis de montrer la présence de monoalcoxysilanes ainsi qu'une condensation des siliciums constitutifs de la couche d'enrobage. D'après ces mesures, sont greffés entre 2.8 et 3.5 aminopropyldiméthyléthoxysilanes par nm^2 . Ces valeurs sont en accord avec la littérature, et notamment avec une fonctionnalisation maximale d'une bille de silice par du triméthylméthoxysilane de 2.8 monoalcoxysilanes par nm^2 .

Des études de charge de surface ont été également menées à l'aide de la mesure du potentiel de surface ζ . Ce potentiel de surface des particules a été déterminé par une mesure électrophorétique. Brièvement, un système de franges lumineuses est créé par deux faisceaux laser au sein d'une cellule, aux extrémités de laquelle se trouvent des électrodes. Lorsqu'une tension alternative est établie entre ces deux électrodes, les particules chargées présentes dans la cellule entrent en mouvement et traversent le système de franges à une fréquence qui est directement reliée à la vitesse des particules selon l'effet Doppler. Les photons détectés sont ensuite analysés par un corrélateur, ce qui permet de retrouver les valeurs de la mobilité électrophorétique des particules. L'équation de Smoluchowski permet alors de calculer le potentiel ζ . On admet généralement que si le potentiel est tel que $|\zeta| > 30 \text{ mV}$, les NPs sont stables en solution, sinon elles sont instables. Ce potentiel caractérise la valeur de la charge de surface de la double couche en surface de la particule (Cf. section 5.3.2); il dépend de la valeur du pH de la solution. Plus le pH augmentera, plus la charge de surface des particules sera négative. L'allure des courbes de potentiel de surface en fonction du pH sera donc toujours la même, passant d'une valeur positive aux faibles pH à une valeur négative aux forts pH. L'intersection de la courbe avec 0 est appelée point de charge nulle (PCN).

Tandis que les NPs enrobées de silice présentent un PCN à pH 2.5, très proche du point de charge nulle de la silice, les NPs fonctionnalisées avec une amine présentent un point de

charge nulle très différent à pH 5.7. La surface a bien été modifiée, mais la valeur du PCN est assez éloignée de la valeur du pKa de l'aminosilane de valeur 9 : les amines greffées en surface ne sont que partiellement accessibles, et ne participent pas toutes à la charge de surface.

Un dosage par fluorescence réalisé par réaction entre un fluorophore organique (FITC) présentant une fonction isothiocyanate réagissant avec les amines et les NPs fonctionnalisées avec des amines donne une densité de fonctions amines réactives en surface des particules de 0.05 à 0.3 par nm². Le dosage réalisé ne permet donc pas de doser toutes les amines présentes en surface des particules, mais seulement de 3 à 18 % de ces amines. Ce résultat corrobore la suggestion d'une non-accessibilité d'une partie des fonctions amines.

Nous avons donc vu que, si de nombreux aminopropyltriméthyléthoxysilanes ont été accrochés sur la surface des NPs enrobées de silice, seulement une partie de ces fonctions amines sont accessibles pour de futures réactions chimiques. Ceci semble être dû à une interaction entre l'amine et le silicium au pH de la réaction, qui diminue fortement la réactivité et l'accessibilité des amines.

5.2.2 Enrobage par de la silice fonctionnalisée en une étape

Afin d'enrober les NPs par une couche polymérique plus fine que 10 nm, une deuxième voie d'enrobage a été testée, consistant à former un réseau polymérique d'alcoxysilanes fonctionnalisés enrobant les NPs. Pour cela, l'équipe du LPMC a condensé des trialcoxysilanes, *i.e.* des aminopropyltriéthoxysilanes (APTES), en surface des NPs. Une couche de silice formée par complexation de silicates sert d'amorce à la couche de fonctionnalisation. Le schéma de principe de la fonctionnalisation est montré sur la figure suivante.

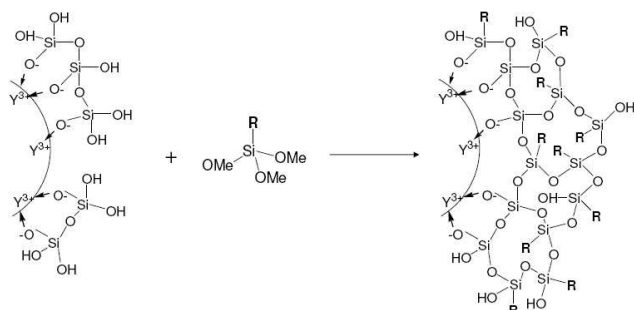


FIG. 5.4 – Schéma de la formation d'une couche fonctionnalisée de silice sur les NPs de $Y_{1-x}Eu_xVO_4$ silicatées avec des alcoxysilanes trifonctionnels. Les flèches indiquent une complexation sur les Yttrium. R correspond aux amines.

Cette fonctionnalisation se déroule en milieu hydro-alcoolique faiblement basique afin d'accélérer l'étape cinétiquement déterminante de l'hydrolyse de l'aminopropyltriéthoxysilane.

Lors de cette fonctionnalisation, des germes de polysiloxanes fonctionnalisés dans la solution peuvent également se former. Une purification par centrifugation permet de les éliminer efficacement.

Le dépôt d'aminopropyltriéthoxysilane sur des NPs a été caractérisé de manière moins poussée que précédemment : seules des analyses par spectroscopie infrarouge et par analyse thermogravimétrique ont été menées.

La spectroscopie infrarouge a permis de sonder les propriétés vibratoires des groupements chimiques présents dans la solution de NPs et notamment les vibrations des alkyls, des liaisons Si-O-Si et des amines. Cette méthode ne permet pas la quantification du dépôt d'aminopropyltriéthoxysilane à cause d'un recouvrement des bandes d'absorption vibrationnelle.

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une méthode de caractérisation généralement couplée à l'Analyse Thermique Différentielle (ATD). Un échantillon est introduit dans un four, sous atmosphère contrôlée. Sa masse est mesurée au cours d'une montée en température. La variation de masse correspond à l'occurrence d'une réaction, dont le caractère endothermique ou exothermique est révélé par l'allure de la courbe d'ATD. De manière générale, cette méthode permet de caractériser le pourcentage de matière organique présent dans un échantillon. En particulier et sous certaines hypothèses^[18], elle a permis de mesurer la perte de masse associée aux aminopropyltriéthoxysilanes et donc de quantifier leur densité de départ.

Ces deux analyses révèlent un dépôt de polysiloxanes atteignant 1.9 à 3.3 nm d'épaisseur et une densité surfacique en aminopropyltriéthoxysilane par nm² de 23 à 53. Cette méthode permet donc de diminuer considérablement l'épaisseur de la couche. Cependant, dans ce cas

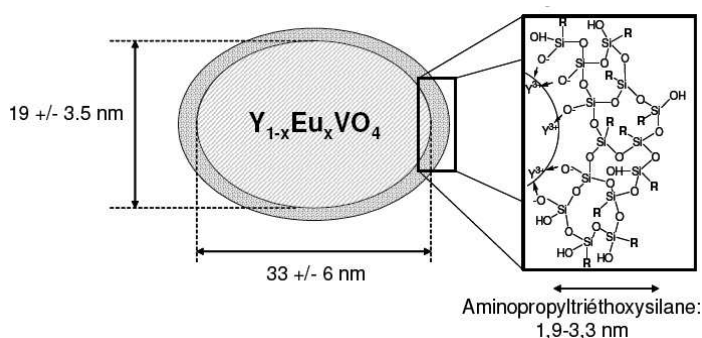


FIG. 5.5 – Schéma de l'encapsulation des NPs par l'aminopropyltriéthoxysilane. R représente le groupe aminé.

de figure, de nombreux aminopropyltriéthoxysilanes sont emprisonnés dans la couche polymérique et ne seront donc pas réactifs.

La surface des NPs fonctionnalisées avec des aminopropyltriéthoxysilanes semble être stabilisée par des amines, comme le montre la valeur du point de charge nulle à pH 9 obtenu en

zétamétrie.

Un dosage des fonctions réactives avec le fluorophore FITC montre une densité variant entre 0.1 et 1.4 amines réactives par nm². Cette densité est supérieure à celle trouvée pour la première approche de fonctionnalisation.

Finalement, du fait de la diminution de l'épaisseur de la couche d'alcoxysilane et de la plus grande densité en fonctions amines, nous avons alors choisi la seconde méthode de fonctionnalisation.

5.3 Couplage des NPs aux protéines : analyse préparatoire

Il s'agit à présent de coupler ces NPs présentant à leur surface des fonctions amines avec des protéines comportant, en général, des fonctions amines, carboxyliques ou thiols libres.

5.3.1 Couplage par "cross-linking"

La réactivité de ces groupes est faible. Ceci implique que pour faire réagir une amine avec une protéine nous allons devoir activer ces fonctions chimiques.

Par exemple, les groupes N-hydroxysuccinimide ester (NHS ester) augmentent la réactivité des acides carboxyliques avec les amines, cette réaction aboutissant alors à une liaison covalente de type amide selon le schéma suivant.

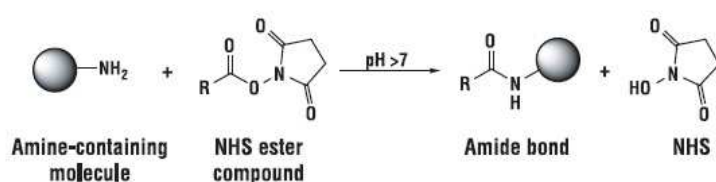


FIG. 5.6 – Schéma de réaction d'acylation entre une amine et un N-hydroxysuccinimide ester. Sur ce schéma, la sphère peut représenter dans notre cas une NP ou une protéine.

Un autre exemple consiste en la réaction d'une fonction maléimide avec un groupe sulfhydryl ce qui forme une liaison stable thioether.

Ainsi, à l'aide d'une de ces activations, la conjugaison entre protéines et NPs peut être effectuée.

Une des méthodes biochimiques classiques est d'utiliser des cross-linkers contenant deux groupements activés. Un des groupements réagit d'abord avec, par exemple, la NP puis l'autre

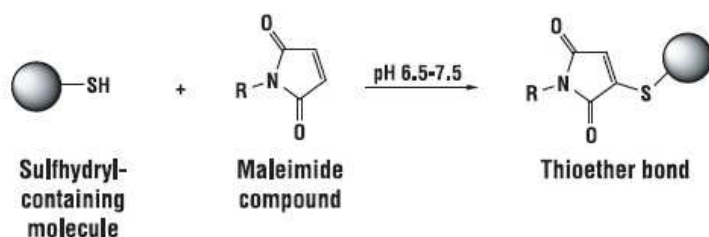


FIG. 5.7 – Schéma de réaction entre un groupe sulfhydryle et un maléimide. Sur ce schéma, la sphère représente la protéine.

groupement réagit avec la protéine. Ces cross-linkers peuvent être hétérobifonctionnels ou homobifonctionnels selon que les groupements activés sont différents ou identiques.

Notre première application était le suivi de la toxine ϵ pour laquelle l'équipe de M. Popoff à l'Institut Pasteur avait déjà réalisé avec succès des conjugaisons ciblant les fonctions amines de cette toxine avec des fluorophores organiques. Notre choix s'est donc porté sur un cross-linker du type di-succinimidyl suberate (*DSS*) comportant deux NHS ester.

Notre seconde application portait sur le suivi intracellulaire d'un fragment de la toxine botulique. D'après les travaux de l'équipe de M. Popoff, cette toxine comporte des fonctions sulfhydryles disponibles et a donc nécessité la mise au point d'un autre processus de conjugaison. Notre choix s'est porté cette fois sur un cross-linker hétérobifonctionnel du type succinimidyl-4-(N-maleimido-méthyl)cyclohexane-1-carboxylate (*SMCC*) portant à la fois une fonction maléimide et une fonction NHS ester.

Ces techniques sont classiques et ne nécessitent pas d'optimisation importante du protocole de couplage. Dans notre cas, le couplage a été rendu extrêmement difficile du fait de l'instabilité des NPs au pH requis pour effectuer le couplage. Nous abordons dans la suite les difficultés associées à la stabilité colloïdale.

5.3.2 Problème de la stabilité colloïdale

Les mesures de zétamétrie et de diffusion dynamique de la lumière (DDL) ont montré que les NPs aminées sont stables en solvant aqueux uniquement dans la gamme de pH telle que $\text{pH} \leq 4$ ou $\text{pH} \geq 10$. A notre connaissance, il n'existe aucun cross-linker commercial fonctionnant dans ces gammes de pH. Le NHS ester du *DSS*, par exemple, réagit avec les amines dans des conditions légèrement basiques pour lesquelles on observe en DDL une augmentation du rayon hydrodynamique des NPs de 1000% en 20 min, temps caractéristique de la réaction d'acylation. Ainsi, l'agrégation des NPs étant beaucoup plus rapide que le temps caractéristique de couplage, le protocole a dû être complètement revu.

Après avoir présenté les conditions permettant d'obtenir une solution colloïdale stable de NPs, nous étudierons quel type de cross-linker est nécessaire pour qu'*in fine* les NPs soient stables puis quel type de solvant est nécessaire pour effectuer le premier couplage entre NPs et cross-linkers.

Théorie DLVO

A ce point de l'exposé, il peut être utile de rappeler la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) qui permet de comprendre les conditions pour lesquelles une solution colloïdale est stable. L'exposé suivant de cette théorie est un résumé effectué à partir de la thèse d'Arnaud Huignard.^[37] Cette théorie s'appuie sur un bilan des forces attractives et répulsives s'exerçant en solution entre particules.^[84]

- Les principales forces attractives entre particules sont les interactions de van der Waals qui proviennent de la fluctuation de distribution de charges électroniques autour d'un atome. L'interaction de deux atomes distants de r est alors de type dipôle induit/dipôle induit et varie en r^{-6} . Dans le cas de deux particules sphériques identiques de rayon " a ", situées à une distance " d " l'une de l'autre, Hamaker a montré que ce potentiel attractif s'écrit : $V = -\frac{Aa}{d^2}$ où A est la constante de Hamaker, dépendant fortement de la nature des particules et du milieu. Sa valeur est généralement comprise entre 0.25 et 25 $k_B T$. La zone d'action des forces de Van der Waals est typiquement comprise entre 0.2 et 10 nm.
 - Il existe deux types de sources d'interactions répulsives qui peuvent s'opposer aux forces de van der Waals et permettre ainsi de stabiliser une solution colloïdale : les forces électrostatiques et l'encombrement stérique.
 - La répulsion électrostatique est due à l'existence d'une charge nette à la surface des particules. Cette charge peut provenir soit de l'adsorption préférentielle d'ions chargés sur la surface soit de la dissociation ou de l'ionisation de groupements de surface. Compte tenu de la nécessité de conserver l'électroneutralité au sein de la solution, la situation peut être décrite par un modèle de double couche, schématisée sur la Fig. 5.8.
- La couche interne est appelée couche de Stern. Elle est constituée de contre-ions fortement adsorbés et de molécules de solvant structurées à la surface des particules. Le rayon extérieur de cette couche de Stern correspond sensiblement au rayon hydrody-

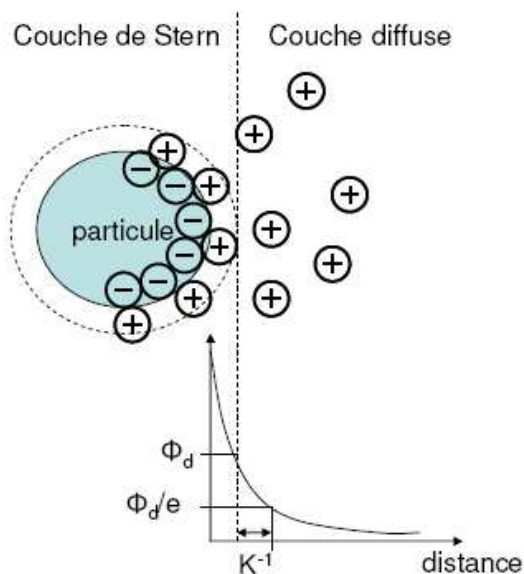


FIG. 5.8 – Modèle de la double couche et évolution du potentiel électrique (ϕ_d potentiel électrique et κ inverse de la longueur d'onde d'écrantage de Debye-Hückel)

namique de la particule (délimitation du plan de cisaillement du solvant lorsque la particule est en mouvement). Le potentiel électrique correspondant ϕ_d est sensiblement égal au potentiel ζ mesuré par mobilité électrophorétique des particules.

La couche externe est appelée couche diffuse. Elle est constituée de contre-ions qui sont soumis au potentiel électrique de la surface et à l'agitation thermique. Au sein de cette couche, le potentiel décroît exponentiellement en fonction de la distance à la surface, avec une distance caractéristique κ^{-1} où κ est l'inverse de la longueur d'écrantage de Debye-Hückel, proportionnelle à la racine carrée de la force ionique du milieu.

Lorsque deux particules chargées sont en interaction, leurs couches diffuses s'interpénètrent, ce qui provoque une augmentation locale de la concentration en contre-ions. On peut en déduire alors un potentiel répulsif résultant.

Aux courtes et aux grandes distances entre particules, ce sont les forces de van der Waals qui prédominent. En revanche, pour des distances voisines de la longueur d'écrantage de Debye-Hückel, la répulsion électrostatique peut prévaloir et conduire à l'existence d'une barrière d'énergie. La stabilité de la solution colloïdale dépend alors de la comparaison de la hauteur de cette barrière avec l'énergie d'activation thermique $k_B T$.

La hauteur de cette barrière d'énergie dépend essentiellement de la charge de surface

et de la force ionique du milieu, cette dernière fixant la longueur d'écrantage de Debye-Hückel. Ainsi, une force ionique faible et une charge de surface élevée permettront une meilleure stabilisation de la solution colloïdale.

- La présence de molécules organiques adsorbées ou chimiquement liées à la surface des particules est une deuxième voie de stabilisation des solutions colloïdales : c'est la stabilisation par encombrement stérique. Ces molécules organiques permettent de limiter la distance d'approche entre particules jusqu'à rendre négligeables les forces attractives de van der Waals. Les principales conditions nécessaires à l'obtention d'une solution colloïdale stabilisée par répulsion stérique sont alors les suivantes : les molécules organiques utilisées, qui sont des molécules simples ou des polymères tel que du polyéthylène glycol (PEG), doivent avoir une forte interaction avec la surface des particules ; il doit exister une affinité élevée entre le solvant de redispersion et les molécules greffées à la surface des particules.

Contrairement aux QDs pour lesquels l'encombrement stérique est en général utilisé, nous avons choisi en réalisant l'enrobage par une couche d'organosilanes aminés d'utiliser la répulsion électrostatique comme moyen de stabilisation colloïdale. Cependant, cette stabilisation n'est pas suffisante. La valeur du PCN de 9 éloignée du pK_a de l'aminosilane (10.25) atteste du fait que la surface n'est pas entièrement recouverte de fonctions amines, elle présente plutôt un mélange de fonctions amines, de fonctions Si-OH et éventuellement de $YVO_4:Eu$ dans le cas où la silice ne recouvre pas complètement le coeur de la NP. Nous estimons que ce mélange de groupes de pK_a différents est à l'origine du problème de stabilité des NPs aux pH neutres.

Choix d'un cross-linker chargé

Nous avons proposé l'idée iconoclaste d'utiliser le cross-linker pour augmenter la répulsion électrostatique entre NPs. Il faut donc choisir un cross-linker qui soit chargé afin qu'avant et après la conjugaison de la protéine il puisse assurer la stabilité colloïdale des NPs. Dans la mesure où le but ultime de cette conjugaison est d'aboutir à une stoechiométrie 1 :1 entre NPs et protéines, nous savons que la quasi totalité des fonctions amines des NPs ne sera pas engagée dans le processus de couplage avec les protéines. Ainsi, si nous choisissons de saturer la surface des NPs avec un cross-linker qui possède deux groupements réactifs chargés, après la première réaction entre NPs et cross-linker, nous devrions avoir des NPs présentant une charge de surface plus importante. L'idée principale est donc énoncée : nous allons saturer

la surface des NPS avec un cross-linker chargé puis faire réagir ces NPs stabilisées avec des protéines.

Le choix du bon cross-linker est, dans ce cas, particulièrement important. Nous avons choisi le bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS³), la forme chargée du DSS mentionnée plus haut (fourni par Pierce). Plus précisément, un groupe sulfonate SO₃⁻ a été rajouté sur chaque NHS ester. De plus, cette addition permet de transformer le DSS, hydrophobe, lipophile et pouvant traverser les membranes cellulaires, en une espèce soluble dans l'eau et lipophile. La structure est donnée ci-dessous.

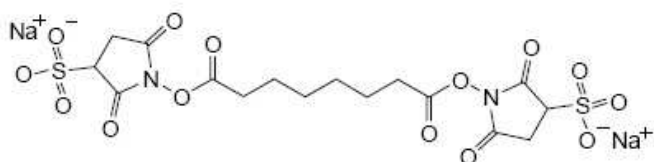


FIG. 5.9 — Formule du bis(sulfosuccinimidyl)suberate

Un point particulièrement important est que les fonctions NHS ester s'hydrolysent facilement dans un solvant aqueux basique. Cette réaction est compétitive de la réaction d'acylation souhaitée. Cependant, en cas d'hydrolyse, le groupement NHS ester sulfoné quitte le squelette carboné et laisse une fonction acide carboxylique qui compte tenu de son pK_a de 4.8 et du pH neutre que l'on souhaite utiliser lors des expériences de suivi de protéine prend la forme carboxylate (RCOO⁻) qui est chargée. Ainsi, avant ou après hydrolyse, le groupement terminal du BS³ et donc la surface des NPs resteront chargés.

Choix du transfert dans un solvant fortement polaire

La stratégie de couplage/stabilisation par le biais du BS³ vient d'être précisée. Il reste à présent à étudier la première étape qui permettra de coupler les NPs aux BS³.

En effet, nous nous sommes intéressés précédemment à la stabilité des NPs une fois les cross-linkers couplés aux NPs. Nous en avons alors déduit quel devait être le cross-linker optimal pour assurer la stabilité à la fois avant et après le couplage aux protéines. Cependant, la réaction de couplage choisie est une réaction d'acylation qui nécessite un solvant aqueux dont le pH est compris entre 7 et 9. En effet, si le pH est plus faible que 7, la réaction n'a pas lieu et s'il est plus grand que 8 la réaction compétitive d'hydrolyse devient prédominante ce qui provoque le départ du groupe NHS ester et ne permet donc plus le couplage entre NPs et

protéines. Or nous avons aussi précisé que les NPs sont absolument instables pour ces pH. Il faut donc dans un premier temps stabiliser la solution de NPs.

Plusieurs possibilités s'offrent à nous. La première consisterait à stabiliser les NPs par effet stérique en couplant de façon covalente un polymère. La seconde serait d'ajouter dans le milieu de réaction un agent complexant sur la surface des NPs tel que le citrate ou l'acide polyacrylique. Il faudrait que la constante d'association de cet agent avec la surface soit suffisamment faible pour permettre la réaction et suffisamment forte pour stabiliser les NPs. Ces deux possibilités nous sont apparues comme difficiles à mettre en oeuvre. La solution que nous avons retenue est un échange de solvant.

Comme nous l'avons vu dans la théorie DLVO, une des caractéristiques essentielles est la couche d'ions qui entoure la NP, on parle de solvatation. Or cette solvatation des NPs dépend évidemment du moment dipolaire du solvant. Ainsi, si nous choisissons un solvant plus polaire que l'eau la solvatation et donc la stabilité des NPs s'en trouveraient améliorées.

Le diméthyl sulfoxyde (DMSO) s'est alors imposé car il présente un moment dipolaire plus fort que l'eau ($\mu_{DMSO} = 3.996$ D et $\mu_{eau} = 1.83$ D) et est en même temps moins toxique que d'autres solvants fortement polaires comme le hexaméthylphosphorotriamide (HMPA) ou le diméthylformamide (DMF).

Cependant, un échange de solvant n'est pas, a priori, neutre quant à la cinétique de la réaction. Nous aborderons par une étude bibliographique l'effet spécifique de cet échange sur cette réaction dans l'annexe B. Le résultat essentiel est que la cinétique de la réaction d'acylation doit être considérablement ralentie dans le DMSO.

5.4 Couplage des NPs aux protéines : protocole et résultats

A l'aide des considérations précédentes, nous allons présenter le protocole choisi pour le couplage des NPs aux protéines. Certains détails du protocole qui n'ont pas encore été présentés seront de plus commentés. Nous montrerons ensuite les résultats qui ont été obtenus tant sur le plan de la stabilité colloïdale que sur la quantification du nombre de protéines par NP. La section suivante sera consacrée à cette même quantification mais effectuée au niveau des NPs uniques.

5.4.1 Protocole de couplage

Nous ne présentons pas ici le travail d'optimisation effectué et montrons directement le protocole définitif. Ce protocole comporte six étapes :

- une sélection en taille par centrifugation,
- un transfert des NPs du solvant aqueux au DMSO,
- la première réaction d'acylation entre les NPs et le BS³,
- un transfert des NPs du DMSO au solvant aqueux,
- la seconde réaction entre NPs activées (NPs-BS³) et protéines,
- une séparation entre protéines libres et NPs couplées aux protéines.

Sélection en taille des NPs

Les synthèses de NPs avec APTES dont nous disposions présentaient une grande variabilité en taille. Afin d'obtenir des résultats reproductibles, nous avons avant chaque fonctionnalisation procédé à une séparation en taille des NPs.

La sélection en taille par chromatographie d'exclusion n'a pas pu être effectuée à cause principalement de problèmes d'accrochage non-spécifique et de stabilité colloïdale à l'intérieur de la colonne. La séparation en taille par centrifugations a alors été choisie.

Les NPs sont d'abord transférées par 3 centrifugations successives dans un tampon acétate (10 mM, pH=4) dans lequel nous savons que les NPs sont parfaitement stables.

Les caractéristiques de cette centrifugation que nous qualifierons par centrifugation longue dans la suite sont les suivantes : rotation à 16000 rcf pendant 80 mn d'une solution de 1 mL de NPs puis redispersion par sonication pendant 10 s du culot. En mesurant l'absorbance des NPs à 280 nm (bande d'absorption des vanadates) avant et après centrifugation, nous avons déterminé que nous perdions à chaque centrifugation 2% de NPs. Le volume typique d'un culot est, dans nos conditions expérimentales, proche de 10 μ L. Ainsi, à chaque centrifugation, nous diluons le solvant initial d'un facteur 100 après redispersion du culot dans un volume final égal au volume initial. Après trois centrifugations, le solvant final ne contient plus qu'une très faible proportion (10^{-6}) du solvant initial.

Des rampes de centrifugations sont réalisées dans le tampon acétate afin d'enlever les grosses et les petites NPs. Typiquement pour enlever la partie supérieure de la distribution, des centrifugations de 3×5 mn à 2000 rcf, 2500 rcf, 3000 rcf, 3500 rcf et 4000 rcf ont été

effectuées. Pour enlever la partie inférieure, les centrifugations de 2×30 mn 9000 rcf ont été choisies (rétention du culot). Dans tous les cas, nous arrêtons les centrifugations lorsque la taille obtenue par diffusion dynamique de la lumière (DDL) donnait un $Z_{average}$ entre 100 et 120 nm. Ce $Z_{average}$ représente la donnée brute du calcul de corrélation (cf Chap. 1). Pour des solutions de NPs suffisamment monodisperses, la transformation de cette donnée brute en distribution de taille de NPs est effectuée à l'aide de l'algorithme "Contin itératif" proposé par Provencher (fourni par le constructeur Malvern). Cette algorithme permet notamment de donner un poids statistique correcte aux petites et grosses NPs. Ce $Z_{average}$ correspond à une distribution en taille présentant en général un pic situé entre 25 et 30 nm. Ce diamètre hydrodynamique correspond à une taille de NPs autour de 20 nm d'après les images de MET.^[18]

Nous obtenons une solution de NPs dont la taille, la concentration et le rendement quantique sont mesurés et serviront de référence pour la quantification de l'efficacité de couplage.

Dans la mesure où lors du couplage protéines-NPs activées la réaction compétitive d'hydrolyse de l'ester se produit, nous devons travailler à une concentration en NPs la plus forte possible afin d'accélérer la réaction. Typiquement, nous utilisons une concentration en vanadate de 30-40 mM ce qui correspond pour une taille de NPs de 20 nm à une concentration en NPs autour de 1 μ M.

Transfert solvant aqueux-DMSO

Trois centrifugations longues sont choisies pour effectuer ce transfert. Dans la mesure où les temps de réaction d'acylation dans le DMSO sont longs, le DMSO doit être parfaitement anhydre.

Première réaction d'acylation dans le DMSO

Nous dispersons le dernier culot dans 1 mL de DMSO anhydre et pompé sous atmosphère d'Argon afin d'enlever toute trace d'humidité.

Domitille Giaume (LPMC) avait effectué un dosage des groupements amines réactives par greffage de FITC. Le nombre d'amines par ion vanadate est égal à 0.014 ± 0.010 . Ainsi, pour une concentration en ions vanadates de 40 mM, nous devons avoir 0.56 mM d'amines réactives. Afin d'éviter tout cross-linking entre NPs, un large excès de BS³ (40 \times) est introduit dans le

mélange réactionnel. Notons que c'est bien la concentration en amine qui doit être considérée et non la concentration en NPs.

Le mélange réactionnel comprend typiquement 30 mg de BS³ ([BS³]=26 mM) et une solution de triéthylamine anhydre ([TEA]=28 mM) afin de catalyser la réaction. Cette solution est laissée à température ambiante et sous atmosphère d'Argon. Au bout d'un temps de réaction de typiquement 7 jours, le transfert inverse (DMSO-solvant aqueux) est réalisé sur tout ou partie de la solution.

Transfert DMSO-solvant aqueux

Trois centrifugations longues sont là aussi choisies. Les deux premiers culots sont redispersés dans du DMSO propre, le troisième dans le solvant de prédilection de la protéine à coupler. Typiquement, nous souhaitons coupler des protéines dont la concentration est de l'ordre de 10 μ M. Il est donc essentiel de retirer tout le BS³ libre afin d'éviter un cross-linking entre protéines : trois centrifugations successives assure un facteur de dilution du BS³ de 10⁶ ce qui est largement suffisant compte tenu de la concentration initiale en BS³ (26 mM). Notons inversement que le DMSO n'est pas complètement retiré lors de la seconde réaction. Une concentration jusqu'à quelques % en DMSO est toutefois bien tolérée par la plupart des protéines.

Seconde réaction d'acylation dans un solvant aqueux

Nous redispersons le dernier culot dans le volume minimal de tampon aqueux (300 μ L) ce qui correspond au volume nécessaire pour pouvoir redisperser par sonication le culot. Généralement, nous utilisons un tampon de type phosphate (40 mM, pH=7.4). La réaction est alors conduite pendant 1-2 heures à température ambiante ou 5-6 heures à 4°C. Typiquement, la concentration initiale en protéine varie de 0.2 μ M à 15 μ M selon le but recherché notamment en termes de nombre de protéines par NP. Généralement, des couplages parallèles et en série sur plusieurs jours sont effectués sur la même solution initiale de NPs de telle sorte à avoir une concentration en NPs de 0.1 μ M pendant la réaction.

Séparation du conjugué NP-protéines des protéines libres

Trois centrifugations longues sont choisies pour effectuer une séparation totale entre les NPs conjuguées aux protéines et les protéines libres. Dans la mesure où les NPs ne subissent aucune altération de leur propriétés de luminescence après congélation à -20°C ou -80°C , la solution finale peut être congelée et les expériences de molécules uniques conduites des semaines après cette fonctionnalisation (sous réserve, évidemment, d'une innocuité de la congélation pour les protéines).

5.4.2 Résultats en terme de stabilité colloïdale et d'efficacité de couplage

Trois propriétés de la solution finale de NPs doivent être identifiées. La première est que les NPs sans protéines doivent être stables en solvant aqueux et en milieu fortement ionique *i.e.* en milieu physiologique. La seconde est que la surface des NPs doit présenter un grand nombre de NHS ester encore actif. La troisième propriété doit être la possibilité de coupler quantitativement les NPs à un nombre déterminé de protéines.

Stabilité colloïdale des NPs

Dans la mesure où *in fine* le nombre de protéines par NP doit être faible, la surface des NPs présentant uniquement du BS³ hydrolysé doit être suffisamment chargée pour assurer une bonne répulsion électrostatique entre NPs.

Le temps de la première réaction d'acylation a été déterminé afin d'obtenir une parfaite stabilité des NPs. Les expériences ont montré qu'en dessous de 7 jours de réaction les NPs s'agrégeaient rapidement sur une échelle de temps caractéristique de l'ordre de la dizaine de minutes. Nous avons choisi un temps de réaction de 10 jours à température ambiante. Ce temps de réaction de 10 jours est tout à fait en accord avec la baisse de réactivité observé par Cline et Hanna dans le cas du dioxane ce qui confirme *a posteriori* la validité de l'interprétation de ce ralentissement dans le DMSO proposée dans l'annexe B.^[85;86] Un temps minimum de réaction de 3 jours a aussi été utilisé en se plaçant cette fois à 50°C . Nous ne reviendrons pas sur cette possibilité car les caractérisations sont moins étoffées. De plus, nous avons choisi de nous placer avec une concentration en base catalytique (TEA) relativement faible (même concentration que le cross-linker). Nous pensons qu'en augmentant la température et la concentration de

catalyseur ou même en changeant la base pour une plus forte (le DMSO étant un acide faible, il accepte les bases fortes), nous pourrions obtenir un temps de réaction autour de 24 heures.

Nous comparons les résultats de DDL pour les NPs avant fonctionnalisation dans du tampon acétate (solution initiale), après fonctionnalisation et hydrolyse du BS³ *i.e.* après 5 heures en tampon phosphate à pH 7.4 et dans une solution PBS ([NaCl]=150 mM, [tampon phosphate]=10 mM). Nous pouvons voir que les distributions sont proches, ce qui indique une

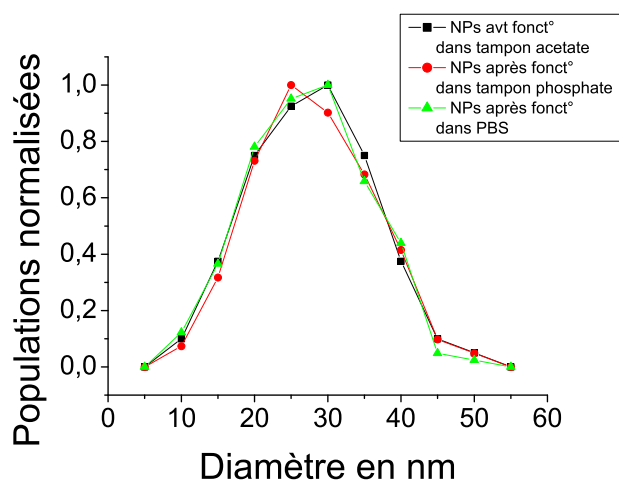


FIG. 5.10 – Histogramme en nombre de NPs obtenu par Diffusion Dynamique de la Lumière : [NPs] 20 nM, tampon acétate (pH=3.8, 10 mM), tampon phosphate (pH=7.4, 10 mM), PBS (pH=7.4, [NaCl]=150mM).

bonne stabilité des NPs et l'absence d'agrégation de NPs au cours de la première réaction d'acylation. Nous insistons sur le fait qu'obtenir cette mesure en DDL de la distribution initiale en taille de NPs a été rendu extrêmement difficile du fait des très nombreuses centrifugations nécessaires pour l'obtenir. Un point important est que ces résultats sont obtenus pour un délai entre la dernière sonication et la mesure de DDL de 60 mn pour la mesure dans le tampon phosphate et de 90 mn pour celle dans le PBS. Ceci assure que la stabilité des NPs sera suffisante pour la plupart des expériences sur cellules.

Ce résultat indique que la surface des NPs a bien été modifiée et que le BS³ chargé a permis de stabiliser considérablement la solution de NPs qui avant fonctionnalisation est totalement instable à ce pH légèrement basique. Ceci sera confirmé par la suite. Notons cependant qu'une mesure de zétamétrie serait une indication plus directe du changement d'état de surface. Ces mesures seront conduites prochainement. En outre, ce résultat n'indique pas si la stabilité est due aux ions sulfonates ou aux ions carboxylates, *i.e.* avant ou après hydrolyse de l'ester activé.

Efficacité de couplage pour l' α -bungarotoxine

Pour caractériser ce couplage, nous avons utilisé l' α -bungarotoxine, une petite protéine de 74 acides aminés ($M_w = 7985 \text{ g.mol}^{-1}$), couplée à un fluorophore organique de type Alexa (Alexa 488, Molecular Probes). Ceci nous permet de nous placer dans des conditions du couplage avec des protéines tout en pouvant doser précisément la quantité de protéines accrochées aux NPs par le biais du fluorophore.

Une calibration de l'émission de l'Alexa (Fig. 5.11) a été effectuée et la proportion de protéines accrochées aux NPs déterminée. Par exemple pour un des couplages, la concentration

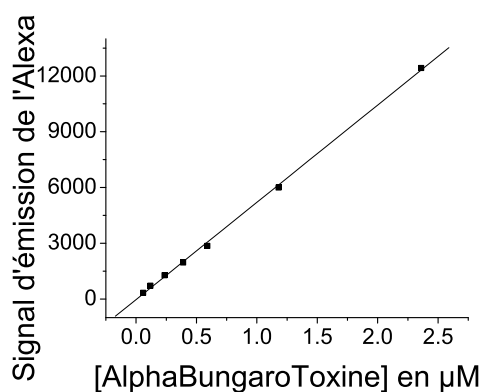


FIG. 5.11 – Calibration de l'émission de l'Alexa488 : excitation à 488nm, émission mesurée par l'aire (S3) du spectre d'émission comprise entre 498 et 700 nm. En rouge, ajustement linéaire : $S3 = 43_{\pm 163} + 5197_{\pm 158} \times [\alpha BungaroToxin]_{\mu M}$

initiale de protéines était de $7.6 \mu\text{M}$ et celle de protéines couplées de $0.807 \mu\text{M}$ ce qui correspond à 10.5% de couplage. Ce taux d'accrochage dépend évidemment de la concentration en NPs. Dans cette expérience, cette concentration était de $0.13 \mu\text{M}$ ce qui correspond à 6.2 protéines par NP. Nous avons de plus vérifié, en analysant les surnageants, que la somme des protéines dans les surnageants contenait exactement la partie complémentaire des protéines couplées. Ceci assure en outre que le rendement quantique de l'Alexa n'est pas différent de celui de l'Alexa couplée aux NPs.

Nous avons déterminé que 30 min seulement étaient suffisantes pour accomplir cette réaction presque totalement en mesurant la concentration de protéines couplées après 30mn (10.5% de couplage), 1h30 (10.8%) et 3h30 de réaction (11.4%). La réaction a été stoppée à l'aide d'un tampon HEPES (115 mM, pH=9) qui provoque une hydrolyse rapide du BS³.

De plus, la concentration finale de NPs est inférieure de seulement 17% à la concentration initiale ce qui correspond exactement à la perte engendrée par chacune des centrifugations.

Pour vérifier que le couplage est quantitatif, des réactions en parallèle avec des concen-

trations initiales en protéines différentes ont été menées (Fig. 5.12). Nous observons bien la

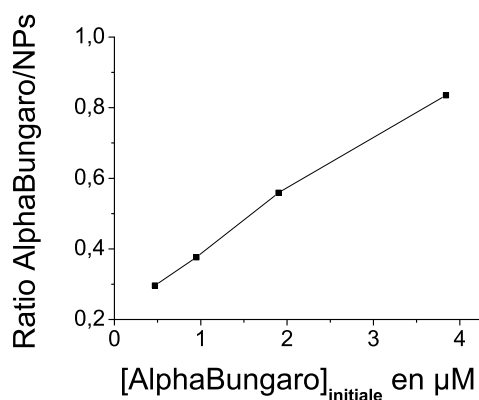


FIG. 5.12 – Quantitativité du couplage exprimée par le rapport protéines/NPs en fonction de la concentration initiale en protéines.

linéarité de l'accrochage dans ces conditions où la concentration initiale en protéines est loin de permettre la saturation de la surface des NPs.

Un dernier contrôle consiste en la vérification de la nature covalente du couplage. En effet, les protéines étant généralement chargées, le couplage pourrait être de nature électrostatique. Après avoir hydrolysé complètement le BS³, un essai de couplage a été réalisé avec une concentration initiale de protéines de 7,4 μM. La concentration de protéines couplées aux NPs est de 0,009 μM ce qui est à la limite de détection. Dans les mêmes conditions et avant l'hydrolyse, nous trouvons 0,27 μM de protéines couplées ce qui correspond à 30 fois plus de couplage covalent.

En termes de couplage de protéines, le rendement de cette réaction entre 5% et 12% reste faible. Ce résultat est certainement partiellement lié au fait que nous utilisons une concentration en NPs faible, typiquement 0,5 μM. Une autre explication pourrait provenir d'une dégradation du BS³ dans le DMSO. Pour vérifier ce point, nous avons comparé la concentration de protéines accrochées lorsque la réaction est initiée dès l'introduction du tampon phosphate ou 30 mn après cette introduction. Nous trouvons qu'il subsiste 72% d'accrochage après ces 30 mn d'hydrolyse. Ceci implique que l'hydrolyse ne peut être tenue pour seule responsable de ce rendement faible. Nous soutenons dans ce qui suit une autre explication qui est liée à l'accrochage de l'Alexa sur la bungarotoxine.

Staros *et al* ont montré que l'amine de la lysine était la plus réactive dans l'attaque nucléophile du NHS ester.^[87] Pour ce premier argument qualitatif, nous considérons que seules les lysines accessibles peuvent réagir. L' α -bungarotoxine constituée de 74 acides aminés comporte 6 lysines dont 3 ne sont pas accessibles. La structure de l' α -bungarotoxine est

montrée ci-dessous (source : RCSB protein data bank). Ainsi, après le couplage avec l’Alexa,

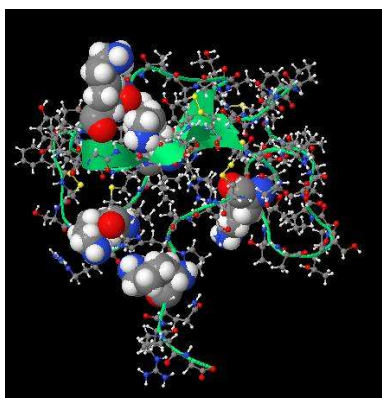


FIG. 5.13 – Structure de l’ α -bungarotoxine : atomes de lysine sous forme de sphères de van der Waals (Azote en bleu, Carbone en gris, Hydrogène en blanc, Oxygène en rouge).

nous verrons dans la section 5.4 qu’il y a 80% de protéines avec 1 Alexa et 20% de protéines avec 2 Alexa, au moins un site sur trois, certainement le plus accessible, est occupé et n’est plus disponible pour la réaction d’acylation. Ceci explique certainement le fait que le couplage de cette toxine aux NPs soit si faible. Nous verrons dans la partie suivante que cette explication est soutenue par la plus grande réactivité de la toxine ε , une protéine de taille plus importante et dont toutes les lysines de surface sont disponibles pour la réaction.

5.4.3 Couplage entre NPs et toxine ε

Après les contrôles effectués sur l’ α -bungarotoxine, nous présentons les résultats obtenus pour le couplage de la toxine ε . Nous détaillerons la structure et l’activité de cette toxine dans le dernier chapitre de ce manuscrit consacré au suivi de toxines ε uniques.

Pour déterminer la concentration de toxine ε couplée aux NPs, nous appliquons cette fois un protocole BCA modifié. Ce protocole est basé sur la réaction entre l’acide bicinchoninique et les amines des protéines qui provoque l’apparition d’une absorption du produit de la réaction (le chélate Cu-BCA) vers 560 nm.

Nous utilisons une boîte de 96 puits dans laquelle est réalisée une calibration identique sur les trois premières lignes avec 7 concentrations différentes de BSA (Bovine Serum Albumine). Dans chaque puits, sont introduits des volumes différents de protéines (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL à 0.2 mg.mL^{-1} de BSA), complétés à 30 μL avec du tampon phosphate (23 mM, pH=7.4), puis 10 μL d’une solution d’hydroxyde de sodium à 0.3 M. La même procédure est appliquée pour le dosage de la toxine ε couplée pour laquelle au moins trois puits sont remplis avec le même volume. Après une attente de 15 min à température ambiante, les réactifs du test BCA

(volume ajouté 200 μL) sont ajoutés à chaque puit. Après le mélange vigoureux des solutions et une attente de 1h à 37°C, l'absorbance de chaque puit à 560 nm est analysée à l'aide d'un lecteur de plaques.

Nous montrons dans la figure suivante un exemple de calibration qui résulte du moyennage des trois premières lignes.

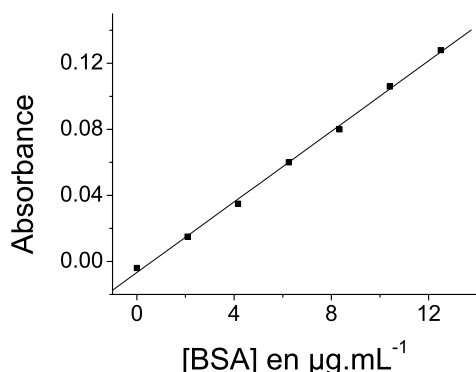


FIG. 5.14 – Calibration du test BCA sur de la BSA.

Une concentration de toxine ε couplée de 5.23 μM a été trouvée pour une concentration initiale de 5.4 μM et pour une concentration en NPs de 0.26 μM . Dans ce cas, le couplage approche les 97% en toxine ε . Les concentrations de toxine dans les surnageants ont été vérifiées et sont proches de 0. De plus, les NPs sans protéines ne donnent pas de signal quantifiable par ce test BCA ce qui indique que ce résultat correspond bien au dosage des protéines. Pour la toxine ε , nous déduisons des concentrations précédentes un nombre de toxines par NP de 20. Ceci est un chiffre trop important. A ce jour, le chiffre le plus faible est de 8.6 toxines par NP obtenu pour les conditions suivantes : 1.1 μM de NPs et 9.3 μM de toxines ε accrochées pour initialement 15.5 μM de toxine.

Dans le cas de l' α -bungarotoxine, l'expérience la plus proche en termes de concentrations initiales était celle avec une concentration de protéines couplées de 0.807 μM pour 7.4 μM initialement et une concentration en NPs de 0.13 μM . Nous voyons que pour une concentration en NPs deux fois supérieure, la toxine ε s'accroche 6.5 fois plus. Nous estimons que le facteur 3.3 observé confirme l'explication proposée précédemment pour le faible accrochage de l' α -bungarotoxine.

5.4.4 Autres couplages

D'autres couplages ont été effectués mais n'ont pas été, pour l'instant, pleinement utilisés ou caractérisés. Pour cette raison, nous ne ferons que les mentionner.

- Nous avons discuté dans la partie consacrée à la stabilité colloïdale l'utilité d'avoir une surface de NPs chargée. Cependant, ces charges vont pouvoir interagir non-spécifiquement avec la membrane des cellules. Dans le cas des QDs, cette difficulté des interactions non-spécifiques a été résolue en partie par l'ajout de polymère, du type polyéthylèneglycol (PEG) sur la surface de ces NPs. Nous avons donc fonctionnalisé nos NPs de telle sorte à ce que les fonctions activées libres (ester activé du BS³ couplé aux NPs) réagissent avec du PEG.

Nous avons réalisé plusieurs essais en utilisant le protocole précédent légèrement modifié. Le temps de réaction minimal pour la toxine ε a été déterminé et vaut 15 min. Nous avons de plus précisé, dans le cas de l' α -bungarotoxine, que le BS³ conservait une bonne partie de sa réactivité (72%) après 30 min dans le tampon phosphate. La réaction de couplage entre les NPs, la toxine ε et le PEG a donc été conduite comme suit : 15 min de réaction avec la toxine ε puis ajout en très large excès d'une solution de PEG (≈ 20 mM) comportant à une de ces extrémités une fonction amine (fourni par Polypure).

Des réactions en parallèle ont été menées avec trois PEG de nombre de sous-unités différents : PEG-7, PEG-15 et PEG-27. Les solutions étant congelées et l'activité de la toxine conservée (cf. chap.5), des tests pour déterminer si les différents PEGs se sont bien accrochés et s'ils réduisent les interactions non-spécifiques seront effectuées prochainement.

- Le deuxième couplage porte cette fois sur l'accrochage de la xanthine oxydase (XO). Nous avons réussi à l'aide du même protocole de réaction à coupler 2 XO par NP. Le but sera d'utiliser ce conjugué dans des expériences de quantification d'espèces oxydantes.

- Le dernier couplage se base non sur le BS³ mais sur le sulfo-SMCC. Ce cross-linker possède deux groupements activés : l'un est un sulfo-NHS ester et l'autre une fonction maléimide qui réagit avec les fonctions sulfhydryles (cf. Fig. 5.7). Le protocole utilisé est le même que celui du BS³ à part le fait que les ponts disulfures de la protéine doivent être cassés avant la réaction entre les NPs activées et les fonctions sulfhydryles. Ceci est effectué classiquement par ajout d'un agent réducteur (TCEP fourni par Pierce) avant la réaction. Des essais sur le couplage de l' α -bungarotoxine qui possède aussi des ponts disulfures se sont montrés concluants. Le mélange réactionnel contient 0.17 μ M de NPs, 7 μ M de α -bungarotoxine et 700 μ M de TCEP

(3 heures de réaction, température ambiante, sans lumière). Après séparation, nous obtenons 0.41 μM de protéines accrochées.

Cependant, des premiers essais de couplage avec cette méthode sur un fragment de la toxine botulique qui sera notre prochaine protéine d'étude se sont révélés infructueux à cause notamment d'une grande instabilité de cette protéine disponible sous forme de protéine recombinante (Institut Pasteur, unité BAT) avec un marqueur His-tag (6 histidines). Ce marqueur His-tag joue certainement un rôle dans l'instabilité de cette protéine.

Toutes les caractérisations précédentes du nombre de protéines par NP sont basées sur un ensemble de NPs en solution. La prochaine partie traite de ces mêmes caractérisations mais au niveau de NPs uniques.

5.5 Quantification du nombre de protéines par NP à l'échelle de la NP unique

Les expériences de caractérisation faites en solution nous donnent des informations importantes mais ne nous renseignent pas sur la véritable distribution du nombre de protéines par NP. Par exemple, pour les faibles nombres de protéines par NP, on peut se demander si la distribution est véritablement poissonnienne ou si une surface trop irrégulière ou trop changeante d'une NP à l'autre n'induit pas un élargissement de cette distribution. De plus, nous n'avons pas encore réussi à séparer nos NPs par des voies électrophorétiques ou par chromatographie d'exclusion. Il n'est donc pas possible de séparer des NPs couplées à des nombres différents de protéines. Plus généralement, il sera extrêmement difficile de séparer ces différents conjugués lorsque la taille des NPs est beaucoup plus importante que la taille des protéines ou quand la distribution en taille des NPs est large. Dans ces cas, il sera impossible de quantifier par séparation cette distribution.

Nous proposons une méthode pour mesurer cette distribution du nombre de protéines par NP. Cette méthode consiste principalement à réaliser un double marquage de la protéine d'intérêt avec une NP et un fluorophore organique et d'utiliser conjointement le photoblanchiment par marche du fluorophore organique et le nombre de photons émis par ces fluorophores pour déterminer précisément la distribution du nombre de protéines accrochées aux NPs. Ces résultats pourront alors être comparés à ceux obtenus en solution. De plus, elle est simple à mettre

en oeuvre et applicable à tous types de NPs. Cette partie a fait l'objet d'une publication récente dans JACS Communications.^[27]

5.5.1 Taille des NPs et nombre moyen de protéines couplées aux NPs

Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé la fonctionnalisation suivante. Le protocole de couplage à l'aide du BS³ est le même que précédemment ainsi que la détermination du nombre moyen d' α -bungarotoxines couplées aux NPs. Dans notre cas, la protéine est déjà couplée avec l'Alexa 488. Nous trouvons pour une concentration initiale de 18.15 μ M et une concentration en ions vanadate de 7.9 mM une concentration d' α -bungarotoxine couplée de 1.26 μ M.

Nous n'avons pas détaillé précédemment comment nous obtenions la concentration en NPs à partir de celle en ions vanadate. Ces deux concentrations sont reliées par le rayon de la NP (R) et le paramètre de maille cristalline qui vaut 0.685 (Cf. chap. 2). Nous réindiquons ici la formule permettant ce passage :

$$[NP] = \frac{[V]}{\frac{4}{3} \times \pi \left(\frac{R}{0.685}\right)^3 \times 4}. \quad (5.1)$$

La taille des NPs est calculée par la méthode décrite au chapitre 2. Les NPs couplées aux protéines sont déposées à la tournette sur une lamelle en silice et le nombre de photons émis par NP est analysé en microscopie en champ large afin de remonter à la distribution en taille des NPs (conditions expérimentales : $n_\sigma = 2.5$ (Cf. Chap. 2 et annexe A), temps d'exposition : 500 ms, intensité incidente : 2.93 ± 0.27 kW.cm⁻², rendement quantique : 12.8% , facteur de photo-réduction : 1.26). La distribution suivante est obtenue :

La taille moyenne de 20 nm est en accord avec celle trouvée en DDL pour une synthèse similaire (cf. Fig. 5.10) et avec celles obtenues en général pour ce type de NPs en MET. Dans ce cas, l'efficacité de détection atteint son maximum ($> 95\%$) pour une valeur inférieure à 15 nm ce qui implique que la distribution observée n'est pas tronquée par la limite de détection. Nous reviendrons plus loin sur ce point. Nous ne pouvons cependant pas expliquer l'asymétrie observée.

De cette histogramme de valeur moyenne 20 nm (écart-type : 4.5 nm), nous déduisons que

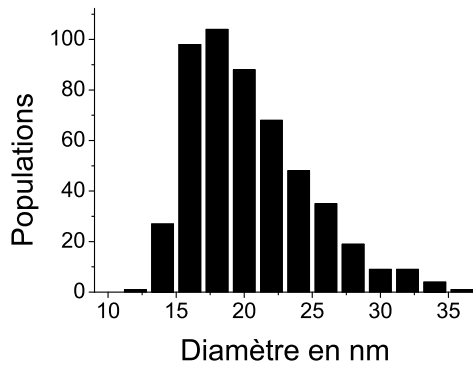


FIG. 5.15 – Histogramme en taille des NPs couplées à l'α-bungarotoxine : détermination optique.

la concentration en NPs est de $0.15 \mu\text{M}$ et que le nombre de protéines par NP de 8 ± 0.8 .

5.5.2 Colocalisation des spots NPs et Alexa

Conjointement à cette dernière expérience, les images correspondant à l'émission d'Alexa ont été enregistrées. Un spot d'émission Alexa peut correspondre à un nombre indéterminé pour l'instant d'Alexa.

Deux filtres interférentiels sont utilisés successivement : l'un pour les NPs ($617 \pm 4 \text{ nm}$) et l'autre pour l'Alexa ($542 \pm 7 \text{ nm}$). Les molécules d'Alexa sont excitées à l'aide d'une des raies Argon à 488 nm jusqu'à extinction de tous les fluorophores. Puis ce sont les NPs qui sont excitées à 466 nm . Les images suivantes montrent la localisation des NPs et des molécules Alexa dans une même région.

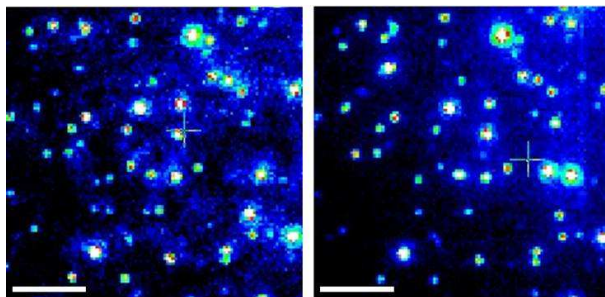


FIG. 5.16 – Images de fluorescence d'une lamelle de silice avec un dépôt d'une solution de conjugué NP-α-bungarotoxine-Alexa. Image de gauche : canal NP ($T_{exp}=500 \text{ ms}$, $I=2.93 \pm 0.27 \text{ kW.cm}^{-2}$). Image de droite : canal Alexa ($T_{exp}=30 \text{ ms}$, $I=0.85 \pm 0.08 \text{ kW.cm}^{-2}$). Echelle : $5 \mu\text{m}$.

On peut observer qu'il existe une colocalisation presque totale entre les NPs et les Alexas. En traitant plusieurs images, nous obtenons en tout un ensemble de 168 spots. Sur ces 168 spots, 17 ne sont pas colocalisés dont 6 correspondant à un spot NP sans Alexa et 11 correspondant à un spot Alexa sans NP. Deux enseignements peuvent être tirés de ces données.

Le premier est à rapprocher du calcul de tailles précédent. En effet, si nous admettons

que les petites NPs ($D < 15$ nm) doivent être aussi couplées à de l' α -bungarotoxine, le fait que seulement 7% (11/162) des Alexa ne soient pas associées à des NPs indique que nous observons bien la très grande majorité des NPs et que la distribution en taille calculée (cf. Fig. 5.15) ne présente pas de seuillage important.

Le second est que seulement 4% (6/157) des NPs ne sont pas couplées à de l' α -bungarotoxine. Le fournisseur (Molecular Probes) assure que la solution de α -bungarotoxine contient moins de 1% de protéines non marquées (séparation par HPLC). Ainsi, le fait de ne pas observer de spot Alexa colocalisé avec l'émission de la NP indique que il n'y a pas de protéines couplées à la NP.

On confirme donc par cette expérience que le couplage a bien été réalisé et ce de manière covalente. En effet, ces expériences intervenant plusieurs jours après la fonctionnalisation, un couplage électrostatique aurait été accompagné d'un fort relarguage des protéines compte tenu du facteur de dilution utilisé.

5.5.3 Estimation du nombre d'Alexa par NP

Nous étudions tout d'abord le photoblanchiment par marches des spots d'Alexa. Cette idée a notamment été utilisée par le groupe de Schmidt pour étudier l'agrégation des canaux calciques^[88] et par le groupe de Selvin pour déterminer la localisation de plusieurs fluorophores situés dans un même spot de diffraction.^[89]

Ce nombre de marches nous permet directement de connaître le nombre d'Alexa par spot et donc le nombre d'Alexa par NP. Dans la section suivante, nous indiquerons comment passer ensuite au nombre de protéines par NP. Sont représentées dans la Fig. 5.17 huit exemples de photoblanchiment de spots Alexa. Nous avons indiqué en rouge les temps pour lesquels nous considérons qu'une marche est présente.

La difficulté réside dans la détermination correcte de ce nombre de marches. Seule une fraction des courbes de photoblanchiment peut être traitée car le bruit est, dans notre cas, assez important. Les courbes présentant 1, 2 ou 3 marches peuvent être identifiées sans trop de difficultés. En revanche, au delà il serait périlleux de penser que le nombre de marches observé correspond parfaitement à la réalité. Par exemple, la courbe de photoblanchiment en bas à droite de la Fig. 5.17 pourrait très bien comporter une marche additionnelle entre le second et le troisième palier. Nous estimons toutefois la valeur moyenne du nombre initial

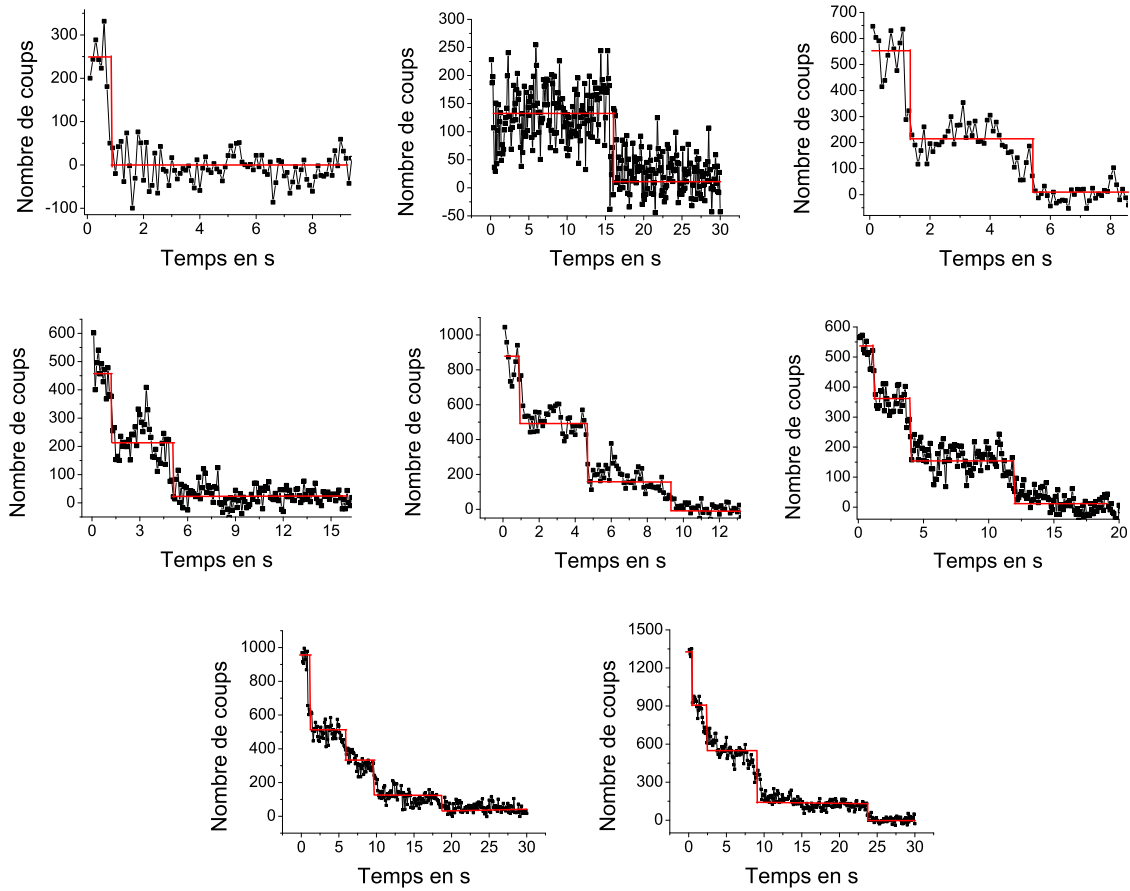


FIG. 5.17 – Exemples de photoblanchiment par marches de huit spots Alexa.

de coups pour les courbes de photoblanchiment présentant 1, 2, 3 et 4 marches à 191 ± 109 , 449 ± 151 , 665 ± 260 et 1107 ± 207 , respectivement. Notons que le nombre de spots traités ne représente que 20% du nombre total de spots Alexa.

Nous ajoutons qu'une polarisation linéaire a été utilisée pour exciter les fluorophores ce qui aurait pu entraîner une sous-estimation du nombre de fluorophores par NP. En effet, les fluorophores dont le dipole est orienté perpendiculairement à la polarisation du laser ne peuvent pas être excités et donc détectés. Cependant, le cross-linker utilisé (BS^3) possède une chaîne carbonée contenant 7 atomes de carbone qui peut autoriser la rotation des fluorophores par rapport aux NPs qui sont fixées à la lamelle et donc par rapport à la polarisation du laser. Ceci conduit à penser que cet effet de sous-estimation du nombre de fluorophores par NP lié à la polarisation du laser est faible. Une polarisation circulaire serait cependant préférable dans les expériences à venir. Enfin, l'utilisation d'une solution sans dioxygène serait préférable

dans la mesure où cela permettrait de détecter plus de photons avant le photoblanchiment des fluorophores.

Nous avons insisté sur le fait que mesurer seulement la distribution du nombre de marches n'est pas suffisant. Le nombre de coups initialement détecté pour un spot Alexa est alors utilisé et les résultats comparés avec la méthode du nombre de marches. Nous représentons la distribution de ce nombre de coups initial dans la figure suivante. Cette distribution présente

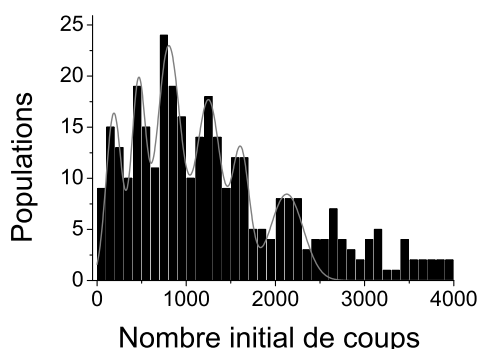


FIG. 5.18 – Histogramme du nombre initial de coups associé à chaque spot d'Alexa et l'ajustement des 6 premiers pics par 6 gaussiennes est montré en bleu (seuls les 4 premiers sont utilisés pour la comparaison avec la méthode des marches). $T_{exp}=100$ ms, $I=0.085\pm0.015$ kW.cm⁻² et $N_{spot\,Alexa}=379$

de nombreux pics bien visibles dont les six premiers ont été ajustés par des gaussiennes. Nous trouvons pour la position des quatre premiers pics (unité : coups) les résultats suivants : 176 ± 176 , 428 ± 29 , 763 ± 94 et 1266 ± 87 , respectivement.

L'accord avec le nombre initial de coups déterminé par les courbes de photoblanchiment est tout à fait satisfaisant : nous en concluons que les pics observés sur l'histogramme de la Fig. 5.18 correspondent bien aux différents nombres d'Alexa par NP. En prenant la moyenne du nombre de coups initial détectés pour chaque spot Alexa, nous estimons que le nombre moyen d'Alexa par NP est de 7.9 ± 0.5 . Pour les mesures d'ensemble nous trouvons 8 ± 0.8 .

5.5.4 Estimation du nombre de protéines par NP

Il ne nous reste plus qu'à estimer la distribution du nombre d'Alexa par protéines pour connaître à partir des expériences précédentes celle du nombre de protéines par NP.

Nous appliquons la même méthode à savoir nous déposons à la tournette les conjugués protéines-Alexa sur une lamelle en silice et nous analysons le nombre de marches pour chaque spot.

Nous rappelons que le fournisseur assure qu'il n'y a pas de protéines non-marquées (en fait 1% que nous négligeons). Nous montrons 4 exemples de photoblanchiment dans la Fig.

5.19. Ces résultats sont plus facilement analysables : sur 126 spots Alexa traitables (80% du

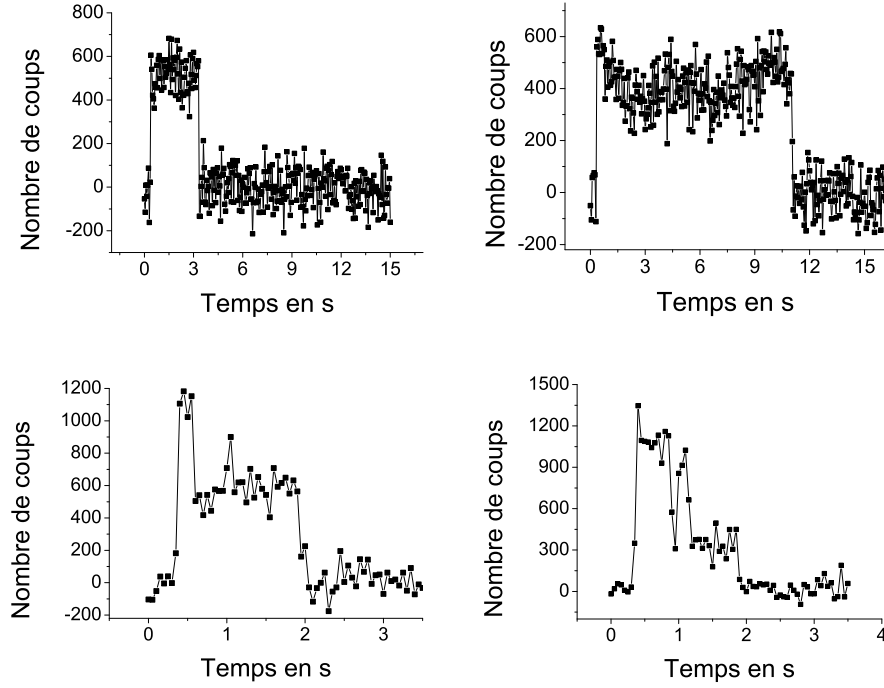


FIG. 5.19 – Courbes de photoblanchiment de 4 spots Alexa. La montée du signal correspond à l'ouverture de l'obturateur d'excitation au début de l'acquisition. $T_{exp}=50$ ms, $I=0.25\pm0.04$ kW.cm⁻².

total), 78.6% présentent une marche, 19.8% deux marches et 1.6% trois marches. Nous avons considéré par souci de simplicité que 80% des protéines étaient liés à 1 Alexa et le reste à 2 Alexa. Pour calculer la distribution en termes de nombre de protéines par NP, nous avons choisi de calculer les différentes probabilités combinatoires comme suit.

La probabilité qu'une NP soit couplée à une molécule Alexa (M1) s'écrit comme le produit de la probabilité qu'une Alexa soit couplée à une protéine (Q1) et de la probabilité qu'une NP soit couplée à une protéine (P1). On en déduit les autres probabilités de proche en proche ce qui s'écrit :

$$M_1 = P_1 Q_1 \quad (5.2)$$

$$M_2 = P_2 Q_1^2 + P_1 Q_2 \quad (5.3)$$

$$M_3 = P_3 Q_1^3 + 2P_2 Q_1 Q_2 \quad (5.4)$$

$$M_4 = P_4 Q_1^4 + P_2 Q_2^2 + 3P_3 Q_1^2 Q_2 \quad (5.5)$$

$$M_5 = P_5 Q_1^5 + 4P_4 Q_1^3 Q_2 + 3P_3 Q_2^2 Q_1. \quad (5.6)$$

En se basant sur les surfaces associées à chaque gaussienne de l'ajustement de l'histogramme (cf. Fig. 5.18), on peut déterminer les probabilités M_i et en déduire les probabilités P_i avec $Q_1 = 0.8$ et $Q_2 = 0.2$. Nous résumons ces résultats dans le tableau suivant :

| i | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | >5 |
|--|-----|-----|----|-----|-----|----|
| Probabilité d'avoir i Alexa/NP (%) | 9.1 | 9.5 | 19 | 16 | 7.5 | 31 |
| Probabilité d'avoir i Protéines/NP (%) | 11 | 11 | 31 | 8.4 | 3.5 | 35 |

FIG. 5.20 – Tableau récapitulatif des probabilités associées aux nombres d’Alexa et de protéines par NP.

Ceci constitue le résultat principal de cette méthode : nous pouvons, à l’aide d’une approche de NPs uniques, déterminer la distribution de protéines par NP.

Un point important est que le pic de cette distribution (3 protéines par NP) ne correspond pas à la valeur obtenue par les expériences en solution (8 protéines par NP). En revanche, le nombre moyen de protéines par NP est proche de 8 ce qui est en très bon accord avec les mesures d’ensemble. Ceci est certainement dû à la présence de NPs de taille importante couplées à un grand nombre de protéines qui font dévier le résultat moyen du résultat du pic de la distribution.

Pour aller plus loin, nous avons voulu savoir si le lien entre la taille des NPs mesurée à partir de la luminosité de chaque spot et le nombre de coups associé à chaque spot Alexa nous permettait de retrouver une dépendance surfacique du nombre de protéines par NP. Pour ce faire, nous utilisons les expériences de colocalisation. La figure suivante représente la racine carrée de ce nombre de coups détectés en fonction de la taille des NPs. Pour des résultats plus clairs, nous avons regroupé les NPs par tranches de taille de 2nm (barre d’erreur horizontale) en moyennant le signal des spots Alexa correspondant (barre d’erreur verticale). Ces barres d’erreur indiquent donc simplement l’écart-type des valeurs prises dans chaque tranche. L’importance des valeurs des écart-types verticaux provient du fait que, pour chaque taille, une distribution poissonnienne autour d’une valeur centrale est attendue pour le nombre d’Alexa par NP. Une dépendance linéaire est trouvée comme on pouvait s’y attendre en notant que le nombre de protéines par NP dépend de la surface de la NP.

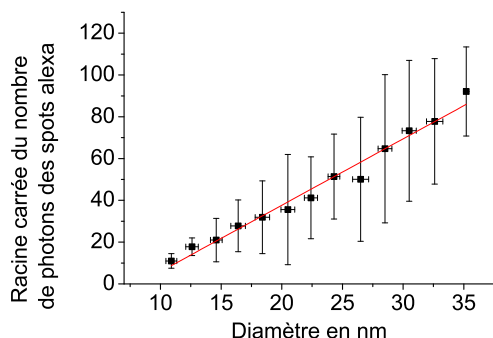


FIG. 5.21 — Racine carrée du nombre de coups associé à chaque spot Alexa en fonction de la taille de la NP correspondante. La taille a été déterminé à partir de la luminosité de la NP à l'aide de la technique présentée dans le chapitre 2.

5.6 Conclusions

En conclusion, nous pouvons faire le bilan des résultats obtenus dans ce chapitre portant sur la fonctionnalisation des NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}$. L'équipe du LPMC a réussi à encapsuler ces NPs par une coquille polymérique de silice selon deux méthodes aboutissant soit à une couche épaisse de silice de l'ordre de 10 nm soit à une couche fine de l'ordre de 2.5 nm. Nous avons choisi d'utiliser les NPs avec une couche fine de silice. Cette couche comporte en outre des fonctions amines permettant le couplage des NPs avec les protéines. Un couplage à l'aide d'un cross-linker homobifonctionnel a ensuite été mis au point et comporte deux étapes. La première est constituée par la réaction du cross-linker avec les amines présentes à la surface des NPs dans du DMSO, un solvant organique permettant de stabiliser les NPs. A l'issue de cette première étape, l'augmentation de la charge de surface des NPs permet de stabiliser les NPs. Ensuite, la seconde étape permet le couplage entre NPs et protéines. Le processus de couplage avec les protéines a été évalué en termes de stabilité finale des NPs et de quantitativité du couplage des protéines. Enfin, une technique originale de détermination de la distribution du nombre de protéines par NP a été proposée. Elle se base principalement sur un couplage préalable de la protéine à coupler aux NPs avec un fluorophore organique. Des mesures conjointes réalisées sur ce fluorophore organique à savoir le photoblanchiment par marches et le nombre de photons détectés initialement permettent alors de quantifier cette distribution. Enfin, en termes d'applications biologiques, nous pouvons envisager de mesurer les marches de photoblanchiment des fluorophores organiques puis de sélectionner uniquement les trajectoires (Cf. chap. 6) ou d'autres caractéristiques des NPs couplées à un nombre déterminé de protéines.

Chapitre 6

Détection de peroxyde d'hydrogène

6.1 Introduction

Nous proposons dans ce chapitre une nouvelle méthode de détection de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) intracellulaire à base de NPs d'oxyde dopées par des ions lanthanides, $\text{Y}_{1-x}\text{Eu}_x\text{VO}_4$. Nous avons montré dans le chapitre 3 que ces NPs, détectables individuellement, présentent un recouvrement de leur photoluminescence lors d'un ajout de H_2O_2 . Cette dépendance devrait permettre une mesure quantitative de la distribution locale et de la dynamique de production de H_2O_2 suite à une stimulation extérieure. Notre approche sera utilisée pour déterminer le rôle de H_2O_2 produit par la NADPH oxydase membranaire dans la transactivation entre récepteurs et pourra être étendue au vaste ensemble des voies de signalisation via le H_2O_2 . Nous présenterons dans ce chapitre les premiers résultats portant sur la faisabilité de la détection de H_2O_2 avec ce type de NPs et sur l'activité de la NADPH oxydase. Plus précisément, après avoir présenté le rôle de H_2O_2 dans les processus de signalisation vasculaire, nous étudierons les différents types de senseur à H_2O_2 existant. Nous détaillerons ensuite l'effet de H_2O_2 sur la luminescence des NPs dans des expériences sur un ensemble de NPs puis en NPs uniques ce qui nous permettra de proposer différents moyens pour quantifier des changements de concentration en H_2O_2 . Enfin, nous utiliserons cette détection de H_2O_2 pour étudier l'activité de la NADPH oxydase suite à une stimulation hormonale. Cette recherche a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Pierre-Louis Tharaux, néphrologue, du centre de recherche cardiovasculaire Inserm-Lariboisière.

6.1.1 Contexte biologique

Le peroxyde d'hydrogène est une molécule utilisée à forte concentration par les organismes vivants comme outil de défense. Longtemps considéré uniquement comme une molécule toxique, son rôle à faible concentration en tant que molécule de signalisation a été progressivement reconnu.^[90] Il intervient, en particulier, dans des processus de signalisation cellulaire basés sur des mécanismes d'oxydo-réduction tels que l'oxydation des résidus cystéine modifiant l'activité catalytique de certaines protéines, et induit diverses réponses physiologiques comme la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration.^[91] Par ailleurs, à plus forte concentration, le peroxyde d'hydrogène joue un rôle important dans le déclenchement de l'apoptose.^[92] Enfin, une augmentation de la concentration en H_2O_2 a été reliée notamment à la pathogénèse de nombreuses maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension, l'athérosclérose, la resténose et les crises cardiaques congestives.^[93]

Une production transitoire de peroxyde d'hydrogène est stimulée par une grande variété de facteurs de croissance et de cytokines, tel que le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'insuline, le TNF (Tumor Necrosis Factor) et l'interleukine-1 (IL-1). Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène et les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) dans leur ensemble jouent un rôle central dans la signalisation, la régulation du tonus et le remodelage vasculaire.^[94;95;96] Nous nous intéresserons dans la suite à la signalisation vasculaire. Les deux schémas ci-dessous montrent les différentes sources de H_2O_2 , dont la NADPH oxydase est la principale (schéma de gauche), ainsi que la variété des voies de signalisation régulées par les ROS (schéma de droite).^[94]

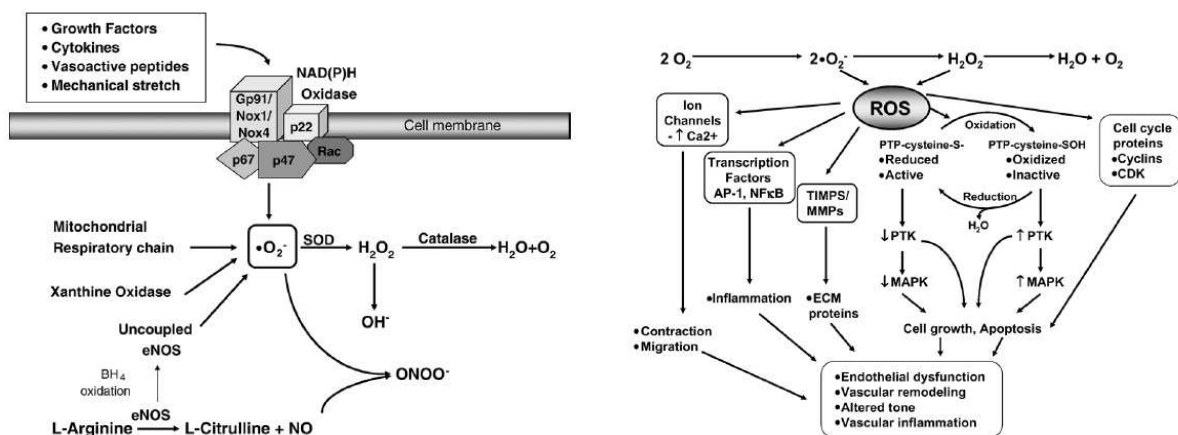


FIG. 6.1 – Schémas présentant le rôle de la NADPH oxydase dans les mécanismes de production de ROS (gauche) ainsi que les voies de signalisation régulées par les ROS. Figures extraites de la référence^[94].

L'enzyme NADPH oxydase est responsable de la production de peroxyde d'hydrogène dans les neutrophiles où il est utilisé pour l'élimination de microorganismes étrangers. Cependant des isoformes de cette enzyme sont présentes dans pratiquement toutes les cellules et tous types de tissus où le peroxyde d'hydrogène produit intervient dans un grand nombre de processus de régulation réversible.

Nous nous intéresserons plus précisément à la génération de H_2O_2 induite par l'endothéline-1 (ET-1) et à son rôle dans la transactivation du récepteur de l'EGF. L'ET-1 est une hormone peptidique constituée de 21 acides aminés présentant un fort effet vasoconstricteur et mitogénique. L'ET-1 se fixe sur son récepteur membranaire ce qui provoque une stimulation de la NADPH oxydase et la production de H_2O_2 . Il a été proposé que le H_2O_2 ainsi généré participe à la transactivation du récepteur de l'EGF induit par l'ET-1 selon le schéma de régulation ci-dessous.^[97] L'activation du récepteur d'ET-1 provoque l'activation de métalloprotéinases (MMP) qui clivent le proHB-EGF membranaire pour libérer le HB-EGF (Heparin Binding EGF) actif qui à son tour active le récepteur de l'EGF. L'activation de ce récepteur est régulée par la phosphorylation de résidus tyrosine. Son état d'activation dépend de l'activité relative d'une tyrosine kinase qui phosphoryle le récepteur et d'une tyrosine phosphatase (SHP-2) qui le déphosphoryle. Le H_2O_2 généré par la stimulation de la NADPH oxydase oxyde le résidu cystéine du site actif de la tyrosine phosphatase SHP-2 et inactive cette enzyme jouant ainsi un rôle important dans la transactivation du récepteur EGF induit par l'ET-1 et aboutissant à la prolifération cellulaire. La NADPH oxydase joue un rôle central dans cette transactivation et plus généralement dans la pathogénèse des maladies cardiovasculaires mentionnées précédemment.^[93]

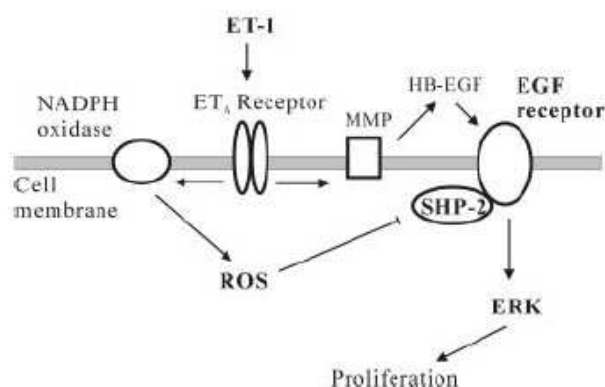


FIG. 6.2 – Génération de ROS induite par l'endothéline-1 (ET-1) et participant à la transactivation du récepteur de l'EGF. Figure extraite de la référence^[97].

Nous allons utiliser les NPs $Y_{1-x}Eu_xVO_4$ pour la détection intracellulaire de montées tran-

sitoires de H_2O_2 suite à la stimulation par l'ET-1. Les NPs seront introduites dans des cellules musculaires lisses vasculaires en culture par lyse osmotique de vésicules de pinocytose.^[98] Nous présenterons dans la suite les premiers résultats obtenus récemment sur la détection intracellulaire de ROS. Ce travail est actuellement poursuivi par Thanh-Liêm Nguyen (LOB) qui replacera cette détection de ROS dans le contexte de la transactivation du récepteur de l'EGF.

6.1.2 Senseurs à peroxyde d'hydrogène

Etant donné sa toxicité, la concentration de H_2O_2 dans la cellule doit être finement régulée aussi bien spatialement que temporellement. Dans ce contexte, disposer d'un senseur local à H_2O_2 quantitatif et dynamique représente un enjeu majeur pour la compréhension de ces mécanismes cellulaires. De plus, de part l'implication du peroxyde d'hydrogène en tant que produit ou réactif de réactions catalysés par des enzymes telles que les oxydases de glucose ou d'amines, les catalases et les peroxydases, sa détection permet d'avoir une vision directe de l'activité de ces enzymes impliqués dans de nombreux processus cellulaires.

Malgré l'importance du peroxyde d'hydrogène en biologie cellulaire, les sondes de peroxyde d'hydrogène dont on dispose actuellement présentent plusieurs inconvénients. Une approche très couramment utilisée consiste en la détection de H_2O_2 via l'oxydation du diacétate de dichlorofluorescéine (H_2DCFDA) en dichlorofluorescéine (DCF), la forme oxydée étant fluorescente.^[99] Cependant, l'exposition de la DCF à la lumière peut produire des dérivés réactifs de l'oxygène induisant une amplification du signal mesuré.^[100;101] Une autre approche utilise l'enzyme peroxydase qui en présence de H_2O_2 et de substrats adaptés (tel que Amplex Red, Invitrogen) donne des produits fluorescents. Cette méthode est très sensible (50 nM de H_2O_2) mais nécessite l'ajout d'enzymes et de substrats et est ainsi réservée à des mesures extracellulaires. De plus, des incubations pendant des durées de l'ordre de 30 min sont préconisées ce qui interdit des mesures de transitoires. En 2002, l'utilisation de la tétracycline d' Eu^{3+} (EuTc) a été proposée par l'équipe de Wolfbeis^[55;102] : une augmentation de la fluorescence est observée en présence de H_2O_2 qui remplace des molécules d'eau, sources de désexcitation non radiative de l'ion Eu^{3+} , en contact avec l'EuTc. Cette sonde commercialisée par Chromeon est prometteuse mais présente une plage de détection de la concentration en H_2O_2 relativement faible (2-200 μM). Très récemment, une protéine fluorescente a été introduite dans le domaine senseur de la protéine OxyR de *Escherichia coli*, protéine spécifiquement sensible à

H_2O_2 .^[103] Le changement conformationnel du domaine senseur en présence de H_2O_2 induit un déplacement spectral de la fluorescence de cette sonde. Cette sonde très sensible n'est cependant linéaire que sur une zone de concentration en H_2O_2 très étroite (8-20 μM). Pour une revue complète des méthodes physiques ou chimiques basées sur une simple oxydation, sur la formation de complexe métallique ou assistées par des enzymes afin de détecter le peroxyde d'hydrogène, nous recommandons chaleureusement la lecture de la thèse de Wu Meng, doctorante de l'équipe du Prof. Wolfbeis, et disponible en anglais.^[104]

A notre connaissance, des mesures quantitatives de transitoires de concentration de H_2O_2 intracellulaire n'ont pas pu être effectuées jusqu'ici. De plus, aucune de ces sondes n'a été détectée individuellement et aucune information sur la distribution locale de H_2O_2 n'est disponible actuellement. Il est important de préciser qu'il est communément admis que H_2O_2 est une molécule qui diffuse librement et rapidement à l'intérieur des cellules et à travers les membranes. Le groupe de Sugita a même proposé que la diffusion de H_2O_2 soit proche de celle du dioxygène et caractérisée par une constante de diffusion de $4\text{-}15 \times 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$.^[105] Cette constante de diffusion implique que, dans une cellule, en quelques dizaines de millisecondes la concentration en H_2O_2 est homogène. Cependant, des expériences récentes ont montré que certaines membranes ne sont que très peu perméables à H_2O_2 . Le transport de cette molécule est en fait régulé notamment par la composition lipidique des membranes, par des effets mécaniques sur la membrane et par la présence d'aquaporines.^[106] Compte tenu des temps d'acquisition nécessaires pour détecter nos NPs ($>50 \text{ ms}$), il sera difficile d'observer localement de différence de concentration intracellulaire de H_2O_2 . En revanche, l'approche en NPs uniques pourra être utile dans des expériences futures en couplant détection de H_2O_2 et ciblage par exemple de lumière de compartiments cellulaires.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord décrire les propriétés photophysiques de nos NPs au contact du peroxyde d'hydrogène. Nous étudierons ensuite l'activité de la NADPH oxydase membranaire lors de l'activation du récepteur de l'endothéline-1.

6.2 NPs de YVO_4 : Eu comme senseurs à H_2O_2

Nous détaillons dans cette partie les caractéristiques principales du recouvrement de la photoluminescence (PL) induit par la présence de H_2O_2 . Nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus sur des NPs déposées à forte densité sur une lamelle en silice. Ceci

nous permettra de dégager les différents paramètres agissant sur le recouvrement de photoluminescence (PL). Nous envisagerons dans un second temps l'effet du H_2O_2 sur des NPs individuelles.

6.2.1 Expériences d'ensemble

Dans la mesure où le photoblanchiment et l'oxydation induite par H_2O_2 des ions Europium sont étroitement liés, nous rappelons brièvement les résultats obtenus sur le photoblanchiment des NPs. Le photoblanchiment des NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}$ est un mécanisme photo-induit présentant des constantes de temps caractéristiques s'étendant sur plusieurs ordres de grandeur. Ce photoblanchiment est entièrement lié à un mécanisme de photo-réduction (PR) des ions Europium trivalents présents initialement dans la structure cristalline. La PR s'explique probablement par le transfert d'un électron d'un défaut cristallin vers l'ion Europium. La dynamique de PR peut être séparée en deux étapes : une dynamique initiale et rapide liée à la PR des ions Europium du cœur de la NP et une dynamique plus lente liée aux ions Europium proches de la surface. Enfin, suite à la PR, l'introduction de H_2O_2 en solution permet une oxydation des ions Europium divalents ce qui se traduit par un recouvrement de la PL des NPs.

Nous présentons tout d'abord une série d'expériences portant sur le recouvrement de PL en fonction de la concentration en H_2O_2 injectée et de l'intensité incidente. Les courbes de PL sont obtenues :

- en déposant des NPs silicatées (dopage 40%) à la tournette sur une lamelle en silice (densité 200 fois supérieure à celle nécessaire pour une observation en NPs individualisées) puis recouverte par une solution de tampon phosphate (pH=7.4, 50 mM),
- en photo-réduisant les NPs pendant 200 s,
- puis en injectant à $t=200$ s une solution de concentration déterminée de H_2O_2 , l'injection et l'homogénéisation de la solution se faisant en moins de 10 s.

Nous retrouvons tout d'abord sur ces courbes de PL (Fig. 6.3) la dépendance en intensité de la PR : plus l'intensité est forte plus la PR est importante. De plus, nous observons que plus la concentration de H_2O_2 est forte plus le recouvrement de PL est important.

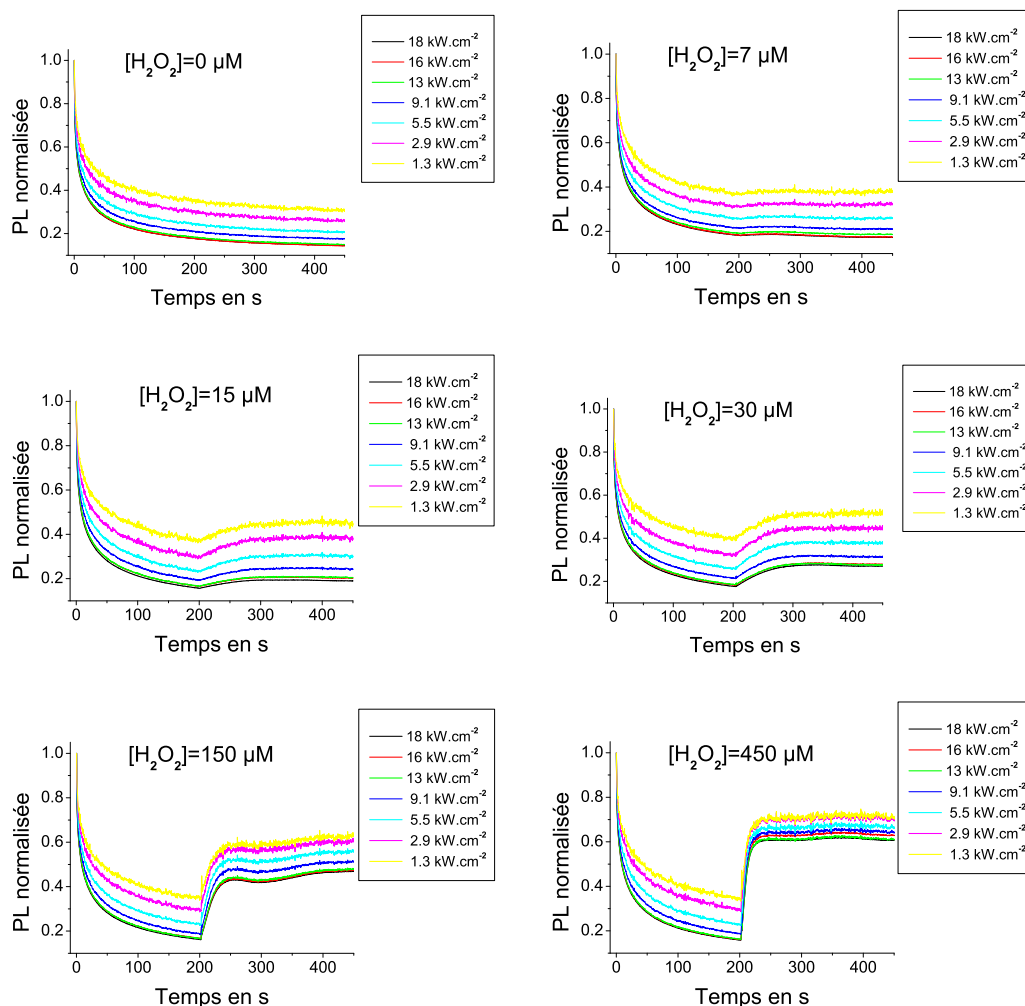


FIG. 6.3 – PL d'ensemble de NPs dans différentes conditions d'intensité incidente et de concentration en H_2O_2 injectée (temps d'injection : $200^{\text{ième}}$ s). NPs silicatées, dopage 40%, $T_{\text{exp}}=200$ ms.

Effet de la concentration en H_2O_2 sur le recouvrement

Afin de représenter cet effet, les courbes de PL de la Fig. 6.3 sont normalisées en moyennant les valeurs de PL sur les 10 secondes précédant l'injection puis en égalisant cette moyenne à 1. Nous montrons dans la Fig. 6.4 le recouvrement de PL induit par différentes concentrations de H_2O_2 et pour une intensité incidente de 5.5 kW.cm^{-2} . Sur cette représentation, nous voyons tout d'abord que même pour des concentrations faibles ($7 \mu\text{M}$) le recouvrement est visible lorsque l'on le compare à l'évolution de la PL sans injection de H_2O_2 . Nous observons de plus que le recouvrement, sans être instantané, est relativement rapide : le temps nécessaire pour arriver à la valeur stationnaire est au maximum égal à 100 s. La rapidité de cette remontée

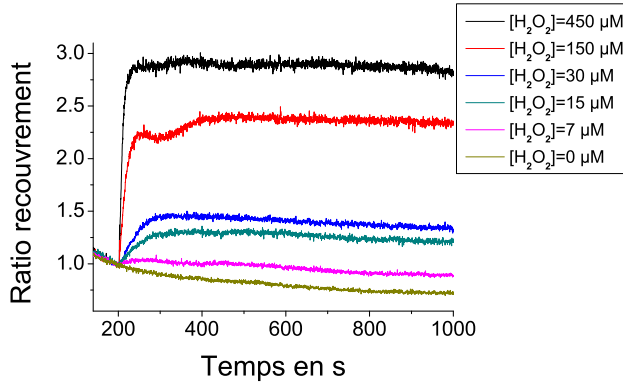


FIG. 6.4 – Recouvrement de la PL pour différentes concentrations de H_2O_2 obtenues à partir de la Fig. 6.3. Les valeurs de PL sont normalisées à 1 avant l'injection du H_2O_2 . NPs silicatées, dopage 40%, $I_{inc}=5.5 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp}=200 \text{ ms}$.

dépend clairement de la concentration en H_2O_2 . Par exemple, pour 450 µM ce temps est égal à 15 s. Sur la courbe obtenue pour une concentration de 150 µM , nous observons une dynamique non-monotone que nous ne pouvons pas pour l'instant expliquer. Notons enfin que ce capteur réagit très rapidement dans la mesure où entre le moment d'injection et le moment où l'on commence à observer un effet sur la PL il ne se passe que quelques secondes.

Nous définissons le ratio de recouvrement comme le rapport de la moyenne des valeurs de la PL à $t=400 \text{ s} \pm 10 \text{ s}$ (valeur de la PL quasi stationnaire) sur celle avant injection $t=190 \text{ s} \pm 10 \text{ s}$. Ce ratio est montré dans la figure suivante en fonction de la concentration en H_2O_2 et pour trois intensités incidentes différentes. Quelque soit l'intensité incidente, le ratio de

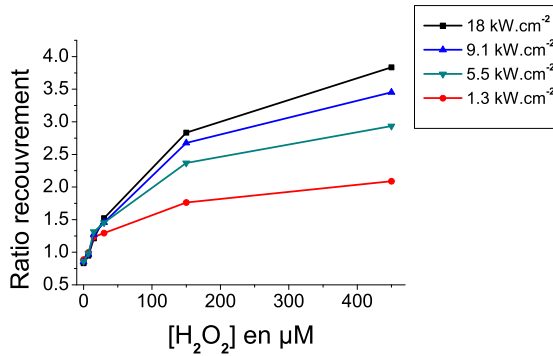


FIG. 6.5 – Ratio de recouvrement en fonction de l'intensité incidente et de la concentration en H_2O_2 . NPs silicatées, dopage 40%, $T_{exp}=200 \text{ ms}$.

recouvrement ne montre pas de dépendance linéaire en fonction de la concentration en H_2O_2 . Nous verrons dans la suite qu'en changeant les conditions expérimentales une linéarité de la valeur stationnaire observée pourra être trouvée entre 3 et 100 µM . Nous remarquons que plus l'intensité est forte plus le recouvrement est important.

Le recouvrement total de PL peut être obtenu pour une concentration en H_2O_2 de 10 mM

(cf. chapitre 3). En revanche, pour 1 mM nous n'avons pas observé de recouvrement total (cf. Fig. 6.9). Ceci autorise à affirmer que ce type de NPs peut être utilisé pour une gamme de concentration en H_2O_2 allant de quelques μM à quelques mM, la réponse de ce senseur n'étant tout de fois pas linéaire pour la gamme entière. Pour une PR aboutissant à 90% de photons émis en moins, le ratio de recouvrement s'étend alors de 1 à 10.

Lien entre pente de recouvrement et concentration en H_2O_2

Afin de voir l'effet de la concentration sur la dynamique de recouvrement, les premiers instants du recouvrement (20 s) observé sur la Fig. 6.3 ont été ajustés par une droite. Nous montrons dans la Fig. 6.6 à gauche un exemple d'ajustement pour une concentration en H_2O_2 de 15 μM et une intensité de 18 $\text{kW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Dans la figure de droite, est indiquée la

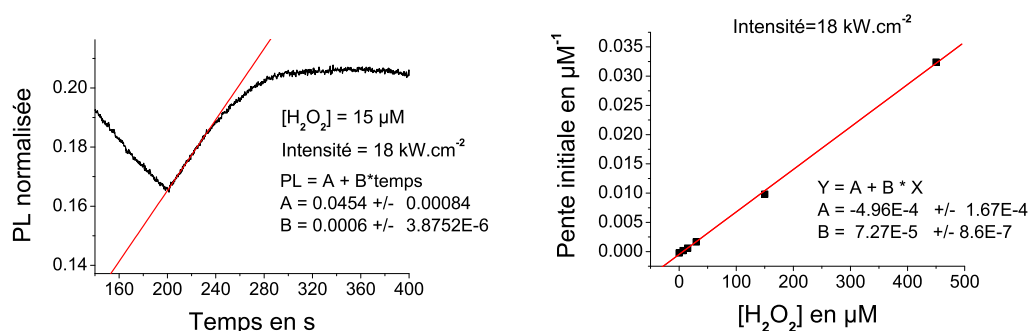


FIG. 6.6 – Ajustement linéaire du recouvrement initial et dépendance en concentration de H_2O_2 de la pente de l'ajustement. NPs silicatées, dopage 40%, $T_{exp}=200$ ms.

dépendance des pentes de l'ajustement linéaire en fonction de la concentration en H_2O_2 pour une intensité de 18 $\text{kW} \cdot \text{cm}^{-2}$. On remarque une remarquable linéarité de cette pente en fonction de la concentration en H_2O_2 . Nous reviendrons sur ce point dans la suite.

Effet de l'intensité incidente sur le recouvrement

Nous montrons dans la figure suivante l'effet d'un changement d'intensité au niveau de la phase stationnaire du recouvrement. Une intensité constante de 8 $\text{kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ est appliquée pendant la PR puis pendant le recouvrement. Ensuite, l'intensité est portée à 12 $\text{kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ puis à 6 $\text{kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ et enfin à 12 $\text{kW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Cette figure montre clairement que pour une intensité supérieure à celle de départ le système va évoluer vers un état d'équilibre avec un signal de PL inférieur à celui que devrait donner proportionnellement cette augmentation

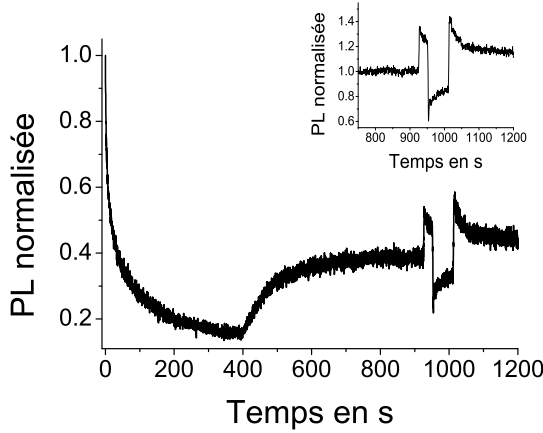


FIG. 6.7 – Effet d'un changement d'intensité sur la phase stationnaire du recouvrement. $[H_2O_2]=25 \mu M$, $I_{inc}=8 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ de 0 à 920 s, puis $12 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ de 930 s à 950 s, $6 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 950 s à 1025 s et enfin $12 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ de 1025 à 1200 s, $T_{exp}=200 \text{ ms}$. NPs silicatées, dopage 40%.

d'intensité et inversement pour une intensité incidente plus faible. Ceci démontre que la phase stationnaire du recouvrement résulte d'un état d'équilibre entre d'une part la PR induite par le laser et d'autre part l'oxydation induite par H_2O_2 . En fait, ce mécanisme d'équilibre est plus complexe que ce que laisse entendre cette dernière expérience.

Afin de clarifier l'effet de l'intensité incidente, nous réalisons les expériences suivantes qui consistent à illuminer les NPs pendant la phase de PR avec une même intensité et pendant celle de recouvrement à des intensités variables.

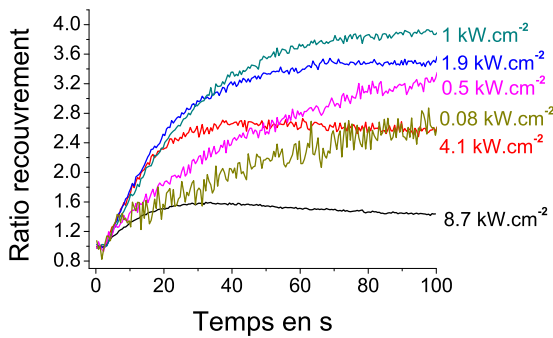


FIG. 6.8 – Effet de l'intensité incidente sur la dynamique de recouvrement. $[H_2O_2]=25 \mu M$. NPs silicatées, dopage 40%, $T_{exp}=200 \text{ ms}$.

Le premier point marquant est que l'utilisation d'intensités différentes permet de moduler d'une manière importante le recouvrement des NPs tant sur le plan de la valeur d'équilibre que sur la dynamique de remontée. Cette propriété intéressante sera utilisée dans la suite dans les expériences intracellulaires.

Pour les intensités décroissantes allant de 8.7 à $1 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$, nous observons un recouvrement dont la pente initiale et la valeur stationnaire sont plus importantes. Ceci est en accord

avec l'expérience précédente : une intensité plus faible permet de déplacer l'équilibre en réduisant l'effet négatif de la PR sur le signal de PL. En revanche pour les intensités encore plus faibles (de 1 à $0.08 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$), nous observons que la pente initiale devient de plus en plus faible. Ceci implique que l'augmentation d'intensité incidente permet, dans ces conditions, un recouvrement plus rapide ce qui est en total désaccord avec ce qui précède.

Pour confirmer cet effet positif du laser, le comparatif d'un recouvrement avec et sans illumination a été mené. Plus précisément, nous avons comparé le recouvrement pour une illumination en continu pendant le recouvrement à celui avec un arrêt de 200 s de l'illumination juste après l'injection de H_2O_2 puis une reprise de l'illumination afin de sonder la valeur de PL après cet arrêt (Cf. Fig. 6.9 points gris et noirs, respectivement). On voit clairement que

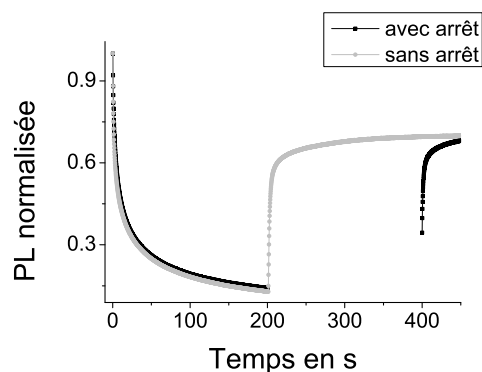


FIG. 6.9 – Effet de l'arrêt de l'illumination pendant la phase de recouvrement. $[\text{H}_2\text{O}_2]=1 \text{ mM}$, $I_{\text{inc}}=8 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$, $T_{\text{exp}}=200 \text{ ms}$. NPs silicatées, dopage 40%.

l'illumination a provoqué un recouvrement deux fois plus important (0.35 après 200 s sans illumination et 0.7 avec illumination). Ceci confirme donc le double rôle du laser : il s'oppose au recouvrement pour les fortes intensités et il le facilite pour les plus faibles. Pour expliquer ces effets paradoxaux, nous présentons dans la partie suivante des recouvrements obtenus avec une illumination laser à des longueurs d'onde non-résonantes avec les niveaux d'énergie des ions Europium.

Effet de longueurs d'onde non-résonantes sur le recouvrement

Nous présentons dans les figures suivantes, l'effet sur le recouvrement de l'illumination à 472 nm, 488 nm et 501 nm. Les NPs sont illuminées pendant 200 s à 466 nm. Ensuite, l'illumination est arrêtée afin de changer de longueur d'onde puis la solution de H_2O_2 est ajoutée pendant l'illumination des NPs à ces autres longueurs d'onde (200 s, même intensité qu'à 466 nm). Enfin, l'illumination à 466 nm est reprise afin de sonder la PL des NPs. Pour

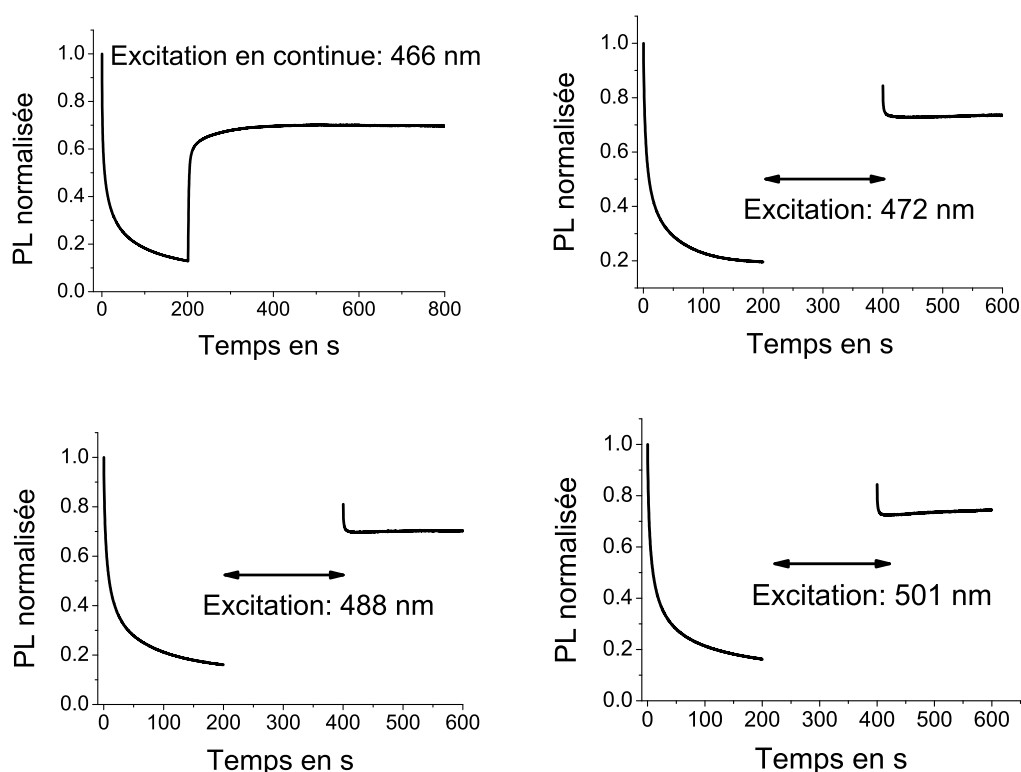


FIG. 6.10 – Effet de la longueur d'onde d'illumination sur le recouvrement. $[H_2O_2]=1$ mM, $I_{inc}=8$ kW. cm^{-2} , $T_{exp}=200$ ms, NPs silicatées, dopage 40%.

les trois longueurs d'onde, nous observons les mêmes effets : à la reprise de l'illumination à 466 nm, la PL décroît rapidement et se stabilise à la même valeur que lors de l'excitation en continu à 466 nm (autour de 0.7). Ceci implique qu'en excitant les NPs à ces longueurs d'onde non-résonantes la PL peut remonter à une valeur largement supérieure à celle qu'elle aurait atteinte sans illumination. De plus, le fait d'observer les mêmes effets quelque soit la longueur d'onde utilisée indique très certainement que ce phénomène non-résonant est aussi présent lors d'une illumination à 466 nm. Ceci permet d'expliquer pourquoi nous avons observé deux effets opposés du laser (Cf. Fig. 6.8). Le premier effet, résonant, permet la photo-réduction des ions Europium trivalents. Le second effet, non-résonant, permet quant à lui d'activer l'oxydation des ions Europium divalents (Cf. chapitre 3). Au fur et à mesure que l'intensité incidente décroît, les dépendances du recouvrement de la Fig. 6.8 décrivent le rapport qui existe entre ces deux effets. Pour les fortes intensités, l'effet de PR domine : lors d'une baisse mesurée de l'intensité, cet effet de PR diminue et le recouvrement est plus fort. En revanche pour les faibles intensités, l'effet d'oxydation photo-induit prédomine : lors d'une baisse de

l'intensité, cet effet diminue et le recouvrement diminue. Ceci permet en outre d'expliquer la décroissance rapide observée lors de la reprise de l'illumination à 466 nm (Cf. Fig. 6.10). Lors de l'excitation non-résonante, le recouvrement n'est pas gêné par la PR ce qui entraîne une valeur au niveau de la reprise plus importante que dans le cas de l'excitation à 466 nm. Le fait de réilluminer à 466 nm, modifie l'état d'équilibre en rajoutant l'effet de PR ce qui conduit à une stabilisation de la PL à une valeur inférieure à celle initiale.

Au delà de l'explication satisfaisante des données expérimentales, ce double effet pourra certainement être utilisé dans des expériences futures en utilisant notamment deux excitations simultanées (résonant et non-résonant). Dans ce cas, l'application des deux excitations redéfinira un nouvel état d'équilibre observé sur les temps longs lors de la PR (Cf. chapitre 3). En utilisant deux intensités incidentes différentes, nous pourrions alors certainement moduler le recouvrement d'une manière encore plus importante que ce que permet à l'heure actuelle une modulation simple de l'intensité incidente à 466 nm. Par exemple, en utilisant l'excitation à 466 nm comme une sonde *i.e.* à faible intensité et l'excitation non-résonnante à forte intensité, nous pourrions certainement obtenir une valeur stationnaire après recouvrement plus importante et une dynamique de recouvrement beaucoup plus rapide. En fin de compte, cette utilisation de deux lasers sera assez proche de ce qu'utilise l'équipe de Zhuang pour moduler la PL du conjugué Cy5-Cy3.^[45] Cette équipe est cependant en mesure d'éteindre et d'allumer ces conjugués ce qui sera difficilement réalisable dans notre cas.

De cette section consacrée au recouvrement de la PL dans le cas de NPs déposées à forte densité, nous pouvons tirer les enseignements suivants. L'effet de H_2O_2 sur la PL se caractérise par un recouvrement important de la PL après la PR induite par le laser. La rapidité du recouvrement ainsi que la valeur stationnaire de la PL observée après cette remontée dépendent clairement de la concentration en H_2O_2 . La dynamique de recouvrement dépend linéairement, du moins pour les 20 premières secondes, de la concentration en H_2O_2 . En revanche, la valeur stationnaire ne dépend pas linéairement de cette concentration mais elle en dépend de manière quantitative sur une gamme allant de quelques μM à quelques mM. Cette valeur résulte de l'équilibre entre la PR et l'oxydation induite par H_2O_2 . L'importance et la rapidité du recouvrement peuvent être fortement modulées par l'intensité d'illumination utilisée pendant la remontée via l'absorption résonante des ions Europium trivalents et l'absorption non-résonante que nous avons attribué à une absorption des défauts cristallins qui facilite le transfert des électrons des ions Europium divalents vers les défauts. Sous cette

apparente complexité, se révèlent en fait des possibilités simples pour adapter la réponse du senseur à des expériences spécifiques. Nous détaillerons notamment dans la suite les conditions d'illumination adaptées à chaque situation expérimentale.

Nous abordons à présent les expériences de réponse du senseur dans le cas de NPs individuelles.

6.2.2 Expériences en NPs individuelles

Nous montrons tout d'abord la courbe de PL de NPs individuelles soumises à une PR pendant 400 s puis à des concentrations de H_2O_2 variables. Nous observons les mêmes ca-

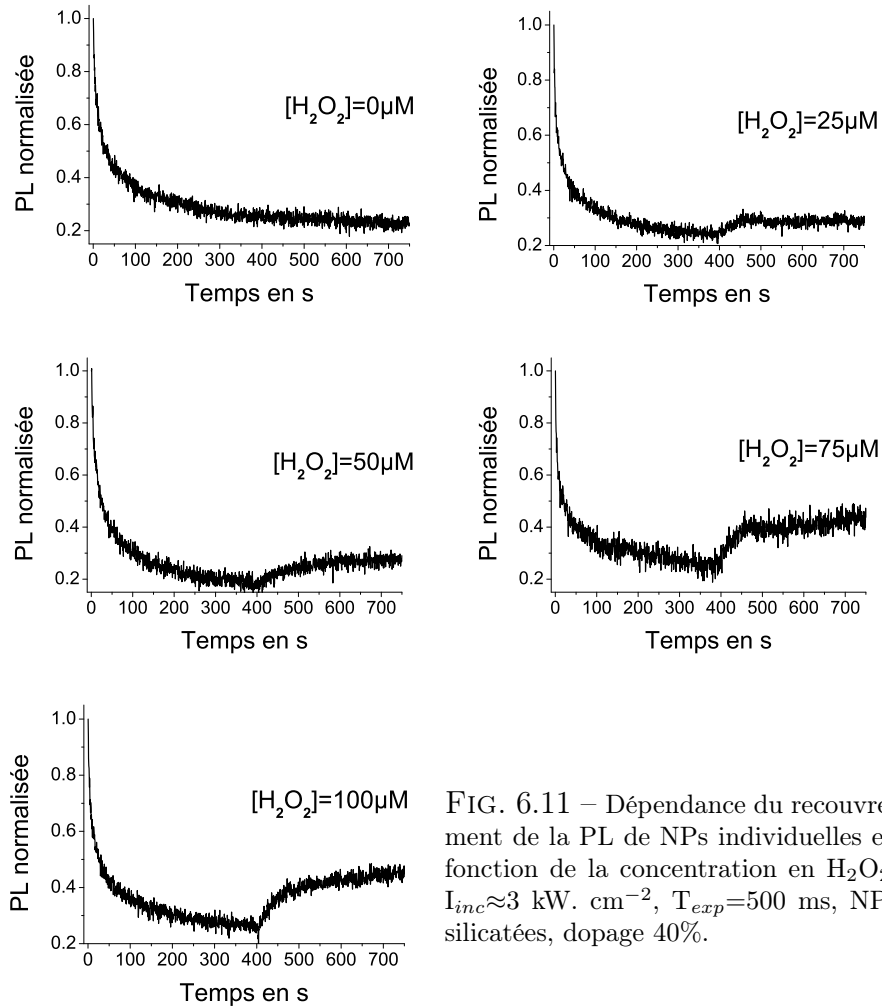


FIG. 6.11 – Dépendance du recouvrement de la PL de NPs individuelles en fonction de la concentration en H_2O_2 . $I_{inc} \approx 3 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$, $T_{exp} = 500 \text{ ms}$, NPs silicatées, dopage 40%.

ractéristiques générales que pour les expériences d'ensemble à savoir un recouvrement qui devient de plus en plus important à mesure que la concentration en H_2O_2 croît. En revanche,

nous voyons apparaître un comportement biphasique du recouvrement : une croissance rapide de la PL pendant 50 s suivie d'une croissance plus lente qui amène à une saturation du recouvrement vers 700 s (cf. cas 100 μM). Nous attribuons ce comportement que l'on retrouve sur d'autres expériences à plus forte concentration en H_2O_2 à une oxydation rapide des ions Europium divalents de surface suivie d'une oxydation plus lente de ceux du cœur. En effet, nous savons qu'en raison, notamment, de leur temps de vie plus faible, les ions Europium de surface présentent une PR moins importante que ceux de cœur : l'excitation résonnante va donc moins s'opposer au recouvrement induit par H_2O_2 . Ces ions Europium vont donc rapidement se retransformer en ions trivalents et ce d'autant plus rapidement que ces ions sont proches de la surface où H_2O_2 agit directement. Nous estimons ensuite que les ions trivalents du cœur de la NP vont être de proche en proche oxydés sous l'effet initial du H_2O_2 en surface.

Un dernier point reste à préciser et concerne le respect de l'électroneutralité à l'intérieur de la NP. Nous savons que le nombre de défauts à l'intérieur de la structure est limité et est de l'ordre du nombre d'ions Europium. Nous savons de plus que l'effet de H_2O_2 est complètement réversible *i. e.* des cycles de PR et d'oxydation peuvent être effectués sans observer de diminution de l'amplitude de PR. Ceci implique que le nombre de défauts disponibles pour la PR ne varie pas à la suite de ces cycles, donc que les défauts ne peuvent pas être oxydés par H_2O_2 . Ceci entraîne que lors de l'oxydation seuls les ions Europium divalents sont oxydés. Si nous tenons compte uniquement de cette oxydation nous sommes confrontés à une sérieuse difficulté portant sur l'électroneutralité des NPs. En effet, à la fin de la PR et avant l'injection du H_2O_2 , les NPs sont neutres et comportent essentiellement des ions Europium divalents et des défauts ionisés. Après injection d'une forte concentration de H_2O_2 et toujours dans l'hypothèse d'un effet unique sur les ions Europium, les NPs devraient présenter alors une charge globale positive. Pour respecter l'électroneutralité, nous sommes conduits à penser que lors de l'oxydation induite par H_2O_2 , les défauts retrouvent, tout comme les ions Europium, leur nombre d'oxydation de départ. Une hypothèse raisonnable consiste alors en le transit des électrons via le réseau des défauts ionisés et non pas uniquement par le réseau des ions Europium divalents. Certains de ces défauts pourraient servir alors à réduire les défauts ionisés.

Détermination de la concentration en H_2O_2 par la valeur stationnaire

Nous abordons à présent la linéarité du recouvrement vis à vis de la concentration en H_2O_2 . Nous avons traité l'ensemble des courbes de PL de NPs individuelles ($N=120$) dont

certains exemples ont été montrés dans la Fig. 6.11 en mesurant le ratio de recouvrement défini comme le rapport entre la valeur à 700 s qui correspond à la valeur stationnaire et celle avant injection. Nous reportons dans la figure suivante ce ratio en fonction de la concentration en H_2O_2 (0, 25, 50, 75 et 100 μM). Nous observons une dépendance linéaire nette de la réponse

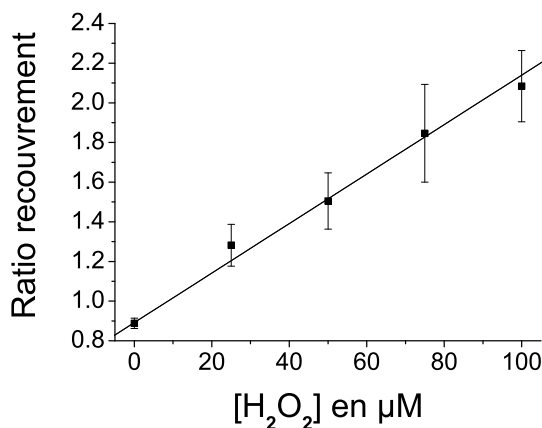


FIG. 6.12 – Ratio de recouvrement en fonction de la concentration en H_2O_2 . Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des valeurs obtenues sur l'ensemble des NPs individuelles. $I_{inc}=8\pm2 \text{ kW. cm}^{-2}$, $T_{exp}=200 \text{ ms}$, NPs silicatées, dopage 40%.

du capteur. La limite de détection à 3σ est dans ce cas de 5 μM .

Nous observons de plus que l'écart-type du ratio de recouvrement défini sur l'ensemble des NPs individuelles reste raisonnable. Deux paramètres influencent cet écart-type. L'intensité incidente, nous l'avons vu, a un effet majeur sur le ratio de recouvrement. Or il est difficile dans une expérience de microscopie d'avoir exactement la même intensité sur tout le champ de vue. Afin d'avoir une statistique sur un nombre plus grand de NP, nous avons préféré montrer les résultats obtenus sur des NPs illuminées par une intensité moyenne de $8\pm2 \text{ kW. cm}^{-2}$. L'autre paramètre important est la taille des NPs. La PR ne dépend que très peu de la taille car elle est liée essentiellement à un effet de volume. En revanche, l'oxydation qui est un effet de surface va dépendre de la taille. Nous avons montré les résultats sur l'ensemble des NPs clairement détectables afin de présenter des résultats à l'image des synthèses dont nous disposons. Compte tenu de ces considérations, nous estimons que les écart-types trouvés sont très satisfaisants pour une approche de NPs uniques. A notre connaissance, cette capacité de détection à l'échelle de la NP unique est une première. Cependant, des efforts importants devront être conduits pour diminuer la dispersion en taille des NPs afin de réduire ces écart-types. Des expériences devront aussi être conduites pour déterminer quelle est la sensibilité de ces NPs à d'autres oxydants tels que l'ion superoxyde ou le radical hydroxyle. Des études préliminaires sont en cours et conduites au LOB par Liem N'Guyen.

Dans le but que nous nous étions fixé, à savoir obtenir une résolution temporelle suffisante pour observer des productions transitoires de H_2O_2 , ce mode de détermination de la concentration en H_2O_2 par la valeur stationnaire est cependant insuffisant. En effet, le temps nécessaire pour obtenir une concentration est de l'ordre de 5 mn. Nous verrons par la suite que ce temps, tout en étant bien inférieur à celui nécessaire pour d'autres senseurs, n'aurait pas permis d'obtenir une résolution suffisante pour l'expérience visant à observer l'activité de la NADPH oxydase lors de l'activation par l'endothéline-1. De plus, les concentrations produites dans ces expériences sont faibles et de l'ordre de 20 μM . Il nous a donc fallu mettre au point une détermination plus rapide et plus sensible.

Nous avons essayé tout d'abord sur les expériences précédentes de baser la corrélation avec la concentration en H_2O_2 sur la valeur de PL à un temps inférieure à celui stationnaire (typiquement à 50 s). Même si cette méthode donne des résultats corrects, une saturation apparaît sur les courbes donnant le ratio de recouvrement en fonction de la concentration en H_2O_2 . De plus, pour des concentrations en H_2O_2 changeantes, il serait difficile de remonter à ces changements de concentration à partir de la dynamique de recouvrement.

Une autre méthode serait d'augmenter l'intensité incidente. En effet, ceci entraîne une augmentation importante de la PR lors du recouvrement ce qui se manifeste par une saturation du recouvrement beaucoup plus rapide (cf. Fig. 6.8). Cependant, dans ce cas, les concentrations en H_2O_2 détectables deviennent de plus en plus faibles et le risque de perturber l'activité cellulaire augmente.

Nous avons abandonné l'idée de déterminer la concentration en H_2O_2 par le biais de la valeur stationnaire car manifestement, en l'état actuel des choses, il existe une incompatibilité entre sensibilité et rapidité de la réponse. Nous proposons dans la suite une autre méthode pour déterminer ces concentrations, adaptée aux expériences sur cellules que nous souhaitons réaliser.

Détermination de la concentration en H_2O_2 par la dynamique de remontée

Nous avons observé dans la Fig. 6.6 que la pente du recouvrement mesurée sur les premiers instants était linéaire avec la concentration en H_2O_2 . Ceci fournit le concept général : nous n'allons pas attendre que la PL atteigne son état stationnaire, nous allons mesurer directement la concentration par le biais de la pente du recouvrement. Cependant, ceci n'est pas suffisant car cette pente évolue au cours de la remontée. Il faut donc se placer dans des conditions

où la PL augmente linéairement au cours du temps pendant une durée au moins égale à la durée du processus cellulaire de production de H_2O_2 . D'après la Fig. 6.8, nous voyons que nous pouvons obtenir une quasi-linéarité de la remontée pour des intensités faibles et sur des temps relativement longs. En d'autres termes, en se plaçant à des intensités faibles nous allons réduire au maximum les effets résonnant et non-résonnant sur le recouvrement induit par H_2O_2 . Dans ces conditions, chaque rupture de pente indiquera un changement de concentration. Cette approche a enfin l'avantage de permettre à des concentrations faibles d'être détectées et de minimiser l'impact de l'illumination sur la cellule.

Nous proposons la méthode suivante pour déterminer la concentration en H_2O_2 , cette méthode sera ensuite utilisée pour mesurer l'effet de l'ET-1 sur la production de ROS. Elle consiste en deux étapes :

- une étape de PR pendant 200 s avec une intensité de $6 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ avec un tampon HBSS (Gibco) à 37° dans le support .
- une étape de recouvrement de 600 s avec une intensité $0.67 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ et une injection de H_2O_2 à la 50^{ième} seconde.

Un exemple de recouvrement pour chacune des concentrations en H_2O_2 ($3.3 \mu\text{M}$, $6.6 \mu\text{M}$, $13 \mu\text{M}$, $26 \mu\text{M}$) est montré dans la figure suivante. Un ajustement linéaire de ces courbes entre $t=50 \text{ s}$ et $t=500 \text{ s}$ est aussi indiqué sur les courbes. Nous remarquons sur l'ensemble des courbes une linéarité du recouvrement en fonction du temps. Pour la concentration la plus forte, nous n'avons pas considéré jusqu'à son terme l'enregistrement de la PL car il s'est produit une défocalisation intempestive qui change la variation du recouvrement et donc la pente associée.

La bonne linéarité observée pendant près de 500 s indique que pour des phénomènes variant moins vite que cette durée la concentration pourra être mesurée à partir de cette pente. De plus, nous avons pour chacune des concentrations réduit la durée sur laquelle sont ajustées par une droite les courbes de recouvrement sans observer de modifications de la valeur de la pente. En fin de compte, la durée minimale pour laquelle l'incertitude sur chaque mesure de pente reste raisonnable fixe notre résolution temporelle. Dans ces conditions expérimentales, cette durée est proche de 30 s et elle est liée essentiellement au bruit de photon.

Nous avons appliqué la même procédure que celle qui est indiquée sur la Fig. 6.13 (ajustement les courbes par une droite entre la 100^{ième} et la 500^{ième} seconde). Pour la concentration en H_2O_2 de $26 \mu\text{M}$, nous avons réduit pour certaines courbes de recouvrement la durée

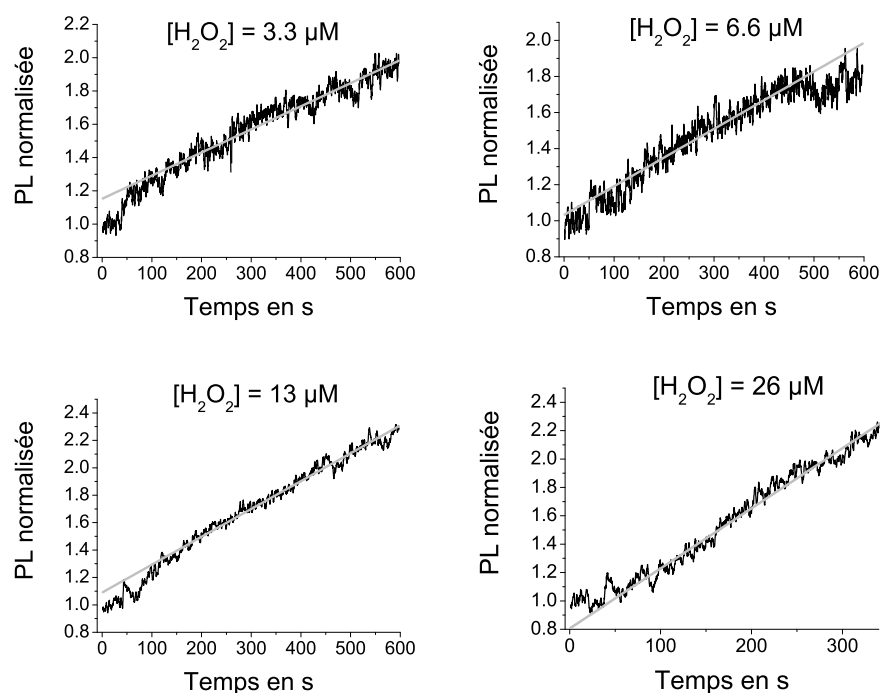


FIG. 6.13 – Recouvrement linéaire de la PL de NPs individuelles pour chacune des concentrations en H_2O_2 . Ajustement réalisé entre $t=100$ s et $t=500$ s (mise à part pour la plus forte concentration pour laquelle $t=100$ s et $t=300$ s). $I_{inc} \approx 0.7 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$, $T_{exp}=200$ ms, NPs silicatées, dopage 40%.

d'ajustement (à 300 s au minimum). La valeur moyenne des pentes de recouvrement ainsi que l'écart-type associé sont reportés dans la Fig. 6.14. Cette figure montre que nous pouvons établir une correspondance nette entre pente de remontée et concentration qui nous servira dans les expériences intracellulaires. Nous avons conduit aussi des expériences à plus faibles concentrations ($0.5 \mu\text{M}$ et $1.6 \mu\text{M}$) qui ont montré là aussi un recouvrement linéaire au cours du temps. Nous n'avons pas ajouté ces points expérimentaux car ils ont été obtenus pour une intensité deux fois plus forte. Le point important est que nous pourrions très certainement par cette méthode déterminer avec une bonne précision des concentrations submicromolaires. Ceci est une preuve de plus de la grande versatilité en termes de plages de détection de ce type de senseurs.

Comparaison avec les autres senseurs

Nous pouvons comparer ces résultats à ceux obtenus pour les autres principaux senseurs à H_2O_2 .

Dans le cas du DCF, la linéarité et la gamme d'utilisation du signal est très étendue (de 50

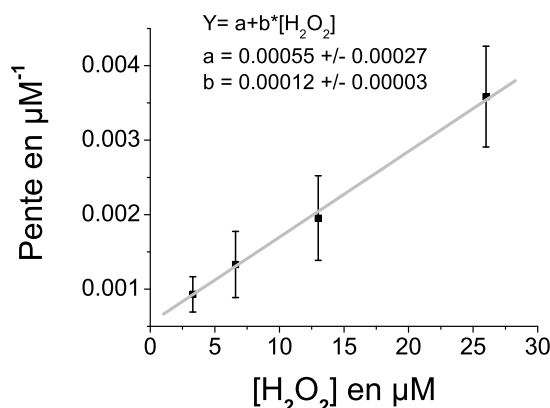


FIG. 6.14 – Pente du recouvrement en fonction de la concentration en H₂O₂ (N=120 NPs). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des valeurs obtenues sur l'ensemble des NPs individuelles. $I_{inc}=0.7 \text{ kW. cm}^{-2}$, $T_{exp}=200 \text{ ms}$, NPs silicatées, dopage 40%.

nM à 200 μM) avec une augmentation mesurée du signal de fluorescence (facteur 4 pour une augmentation allant de 20 à 100 μM). Notre gamme d'utilisation s'étend de qq μM à qq mM mais la linéarité est plus faible (5 à 100 μM). L'augmentation du signal de PL peut aller dans notre cas jusqu'à un facteur 10. Un temps d'incubation de 5 à 15 min à 37°C et l'addition de Fe²⁺ (10 μM) sont cependant nécessaires ce qui n'est pas notre cas.^[99] L'oxydation du DCF est non spécifique à H₂O₂ et peut engendrer lorsqu'il est illuminé une production de ROS. Nous n'avons pas déterminé pour l'instant la réponse de nos NPs à d'autres oxydants mais il semble clair que le recouvrement de PL de nos NPs ne soit pas spécifique à H₂O₂. En revanche, des oxydants à durée de vie courte (ion superoxyde par exemple) auront certainement un effet minime sur ce recouvrement. Le DCF peut de plus traverser la membrane cellulaire mais ne peut pas être fonctionnalisé afin de cibler un compartiment ou une zone du milieu intracellulaire. Nous verrons dans la section suivante que nous pouvons à l'aide de la technique de pinocytose faire pénétrer les NPs dans les cellules. Nous avons vu de plus dans le chapitre 5 que nos NPs pouvaient être fonctionnalisées. Enfin, un point important pour l'étude de phénomènes de production et de consommation de H₂O₂ est que le DCF ne peut pas être réduit contrairement à ce que nous observons sur nos NPs.

L'amplex Red fourni par Invitrogen est spécifique et a une zone de linéarité extrêmement importante allant de 50 nM à 1 mM avec une multiplication de fluorescence par un facteur 50. Cependant, cette méthode nécessite une longue incubation (30 mn) et l'ajout d'enzymes (peroxidases) et de substrats et est ainsi réservée à des mesures extracellulaires.

L'Europium tétracycline a une plage de linéarité s'étendant de 1.8 μM à 200 μM ce qui correspond pratiquement à sa gamme d'utilisation. L'augmentation du signal correspondante

est égale à un facteur 20 et est réversible. Il est spécifique pour la détection du H_2O_2 mais a une forte dépendance vis à vis du pH et de la présence de phosphate, de citrate, de Cu^{2+} .^[55] En ce qui concerne nos NPs, nous n'avons pas encore testé la dépendance du recouvrement par rapport au pH.

Dans le cas de la protéine OxyR modifiée, une grande spécificité, une bonne réversibilité, une faible gamme de linéarité allant de 8 à 20 μM , une augmentation faible de la fluorescence et un temps de montée rapide (quelques secondes) ont été trouvées.^[103]

Il apparaît clairement que chacun de ces senseurs possède au moins un avantage relatif par rapport aux autres. Le choix du meilleur senseur doit donc se concevoir par rapport à une problématique spécifique. Dans le cadre de l'effet de l'endothéline-1 sur la production et la consommation de ROS intracellulaire et pour les raisons que nous venons d'indiquer, le senseur le plus adapté et le plus simple d'emploi se trouve être précisément le type de NPs que nous utilisons.

6.3 Production de ROS stimulée par l'endothéline-1

Nous abordons à présent la détection de la production de ROS intracellulaire suite à l'activation de la NADPH oxydase par l'endothéline-1.

6.3.1 Protocole d'introduction des NPs dans les CMLV

Les NPs ont été introduites dans des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) en culture par lyse osmotique de vésicules de pinocytose.^[98] Cette étape d'introduction des NPs a été réalisée par Thanh-Liêm Nguyen au LOB qui a adapté le protocole du fournisseur à ce type cellulaire. Les CMLV utilisées dans cette étude sont au stade P5 et ont été déposées sur lamelles de verre. Après deux jours et la veille de l'observation en microscopie, le milieu complet (RPMI 1640 avec 20% de serum de veau foetale, Gibco) a été remplacé par du RPMI sans sérum qui peut induire une inactivation des récepteurs d'ET-1. Les NPs silicatées (initialement 150 μL à 18,9 μM en vanadate) ont été diluées dans 350 μL de tampon phosphate filtré. Le tout a été soniqué (10 s) puis centrifugé à 2000 g pendant 5 min. Le culot a été retiré (agrégats) et le surnageant soniqué puis centrifugé à nouveau à 4000 g pendant 30 min afin de séparer les NPs de très faible taille. Le culot a été ensuite suspendu dans 600 μL de solution hypertonique et soniqué (10 s). Ce sont ces NPs qui ont été utilisées pour la calibration

de l'effet de H_2O_2 . Après avoir exposé les cellules au milieu hypertonique ($150\ \mu\text{L}$ pendant 10 min) ce qui induit la formation de vésicules chargées de NPs, les lamelles sont placées dans $500\ \mu\text{L}$ de milieu hypotonique (RPMI dilué à 70% dans de l'eau ultra-pure) pendant 2 min afin d'obtenir la lyse des vésicules. A la fin de ce traitement, les cellules sont remises en condition de culture pour une demi-heure (RPMI, 37°C). Ces lamelles sont enfin placées dans un support contenant du milieu HBSS pour l'observation en microscopie. Le support est maintenu à 37°C ($\pm 0.1^\circ$) pendant toute l'observation à l'aide d'une platine chauffante. La concentration injectée en NPs a été déterminée afin d'avoir quelques dizaines de NPs par cellule. Nous n'avons pas observé d'augmentation significative du nombre de photons moyen des spots de diffraction représentant les NPs ce qui conduit à penser que le processus d'internalisation n'entraîne pas d'agrégation importante des NPs.

Nous montrons dans la figure suivante, les images en lumière blanche et en fluorescence d'une CMLV après introduction des NPs. Les spots lumineux sont associés à des NPs comme nous avons pu le vérifier en illuminant les cellules à $472\ \text{nm}$, longueur d'onde non-résonante avec l'absorption des NPs. Notons la présence à droite de la cellule de NPs défocalisées et accrochées non spécifiquement à la lamelle qui nous permettrons dans la suite de contrôler l'effet de l'ET-1 sur des NPs situées à l'extérieur de la cellule.

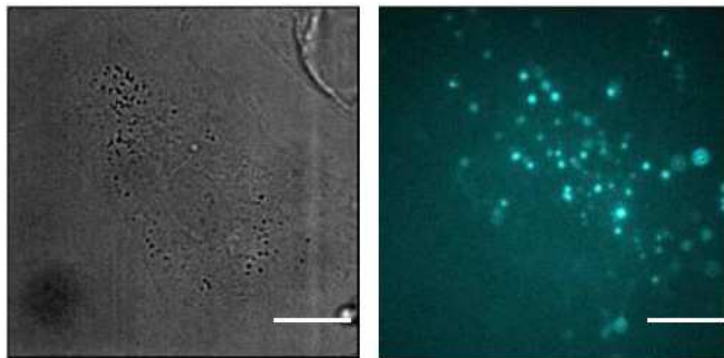


FIG. 6.15 – Image typique d'une cellule musculaire lisse vasculaire en lumière blanche et en fluorescence (excitation : $466\ \text{nm}$, détection : $617\ \text{nm}$, barre d'échelle : $7\ \mu\text{m}$). $I_{inc}=6\ \text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$, $T_{exp}=200\ \text{ms}$. NPs silica-tées, dopage 40%.

6.3.2 Résultats expérimentaux

Comportement biphasique

Après l'internalisation des NPs, la PL des NPs individuelles est observée dans les conditions d'illumination décrites dans la partie précédente (étape 1 : PR, étape 2 : observation du recouvrement à faible intensité). L'ET-1 est ajoutée à la $50^{\text{ième}}$ s de l'étape 2 à une concen-

tration de $1 \mu\text{M}$ ce qui assure une saturation de l'effet de l'ET-1.^[107] Nous présentons les résultats obtenus pour 2 cellules différentes. Des expériences supplémentaires sont en cours.

Nous montrons, dans la Fig. 6.16, 4 exemples de PL de NPs individuelles. Le signal de PL

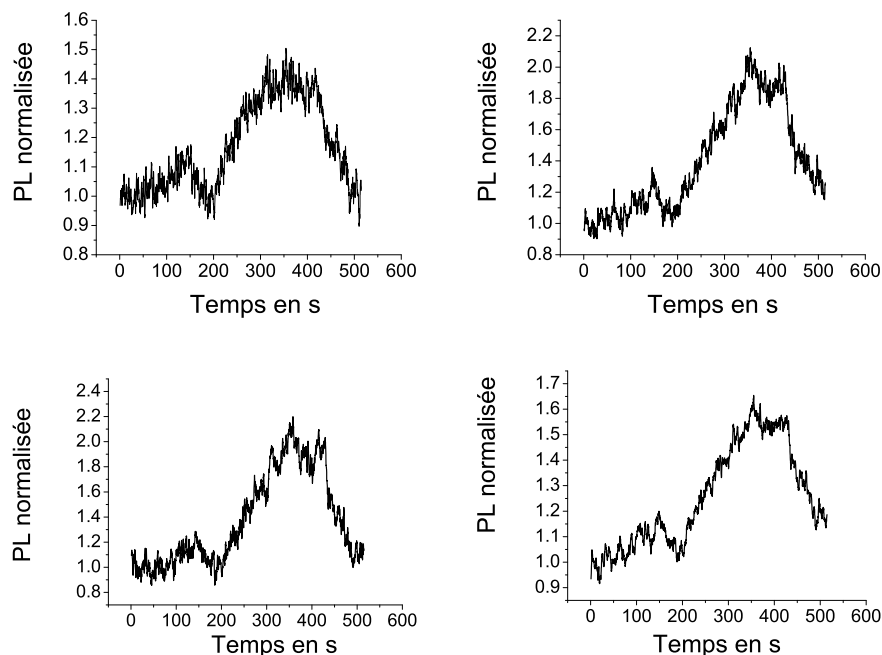


FIG. 6.16 – Recouvrement de la PL de NPs individuelles induite par l'injection de l'ET-1 à la 50^{ième} s. $I_{inc} \approx 0.7 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$, $T_{exp} = 200 \text{ ms}$, NPs silicatées, dopage 40%. NPs observées à l'intérieur d'une même cellule.

présente des caractéristiques que l'on retrouve sur l'ensemble des NPs observées ($N=33$). On observe deux séquences d'augmentation puis de diminution de la PL. La première intervient immédiatement après l'injection de l'ET-1, a une durée moyenne de 150 s et une amplitude faible. La seconde est caractérisée par un recouvrement globalement linéaire commençant à la 200^{ième} s et finissant selon les NPs entre la 300^{ième} et la 350^{ième} s. Ensuite, le signal de PL est quasiment constant pendant 100 s. Enfin, le signal rediminue jusqu'à une valeur proche de celle initiale au bout d'un temps que l'on peut estimer à 100 s.

La première séquence de production de H_2O_2 par sa durée et sa pente faible est difficilement quantifiable en termes de concentration en H_2O_2 . Cependant, nous pouvons affirmer que la concentration en H_2O_2 produite est faible (moins de $5 \mu\text{M}$) et que la présence de H_2O_2 produit par ce premier mécanisme ne dure pas plus de 75 s.

La seconde séquence est largement quantifiable. Nous avons utilisé alors la calibration de la section précédente afin de donner une estimation de la concentration en H_2O_2 présente.

Nous avons fait varier la durée sur laquelle nous ajustons les courbes expérimentales ainsi que le temps initial. De cette première étude ressort que la dynamique de recouvrement peut être divisée en deux phases : une première phase rapide durant 50 s (de $t_1=200$ s à $t_2=250$ s) et une phase plus lente pendant les 100 s suivantes (de $t_2=250$ s à $t_3=350$ s).

En moyenne ($N= 33$ NPs), nous trouvons :

$$\text{Cellule 1 : } \text{pente1} = 0.0049 \pm 0.0012 \mu M^{-1}, \quad \text{pente2} = 0.0029 \pm 0.0010 \mu M^{-1} \quad (6.1)$$

$$\text{Cellule 2 : } \text{pente1} = 0.0050 \pm 0.0012 \mu M^{-1}, \quad \text{pente2} = 0.0034 \pm 0.0013 \mu M^{-1} \quad (6.2)$$

En moyenne l'incertitude associée à la mesure de chaque pente est faible et de l'ordre de 5%. Nous estimons que le fait que la première pente soit plus importante n'est peut être pas lié à une plus forte concentration en H_2O_2 . En effet, nous avons observé sur certains recouvrements (Cf. Fig. 6.13) une augmentation de la PL suite à l'ajout de H_2O_2 plus importante au niveau des 50 premières secondes. Dans le doute, nous préférons ne pas considérer cette première pente. A partir de la valeur de la seconde pente, nous pouvons déterminer l'équivalent en H_2O_2 de la concentration en ROS produite. En moyenne, la concentration présente pendant les 150 s que dure la remontée de la PL est de $22 \pm 8 \mu M$. Il est important de rappeler que le recouvrement linéaire de PL est dû à un déséquilibre entre l'effet photo-réducteur du laser et l'oxydation photo-induite ou spontanée due à H_2O_2 . Ainsi, la stagnation de la PL observée après cette remontée ne correspond pas à une concentration en H_2O_2 nulle mais à celle qui équilibre la réduction et l'oxydation. Cette concentration est nécessairement plus faible que $0.5 \mu M$ puisque pour cette concentration nous avons observé un recouvrement. Ceci explique aussi pourquoi la PL peut diminuer. En effet, lorsque la concentration devient nulle, l'effet photo-réducteur l'emporte sur l'oxydation ce qui aboutit à une chute du signal de PL. Ceci est en effet un des avantages principaux de ce senseur par rapport au DCF qui ne peut être réduit. Nous n'avons cependant pas encore calibré la chute de PL correspondant à une diminution de la concentration en H_2O_2 .

Expériences de contrôle

Trois expériences de contrôle ont été réalisées. Nous avons tout d'abord observé que sans injection d'ET-1, la PL des NPs individuelles intracellulaires ne montrait ni augmentation ni diminution (6 cellules, une vingtaine de NPs par cellule). Ceci montre que l'introduction des

NPs et/ou l'illumination laser n'engendrent pas de production de ROS détectable.

Nous avons de plus observé que la PL de NPs accrochées à la lamelle *i. e.* à l'extérieur de la cellule et à une certaine distance ne variait pas en présence d'ET-1. Ainsi, l'ET-1 n'a pas d'effet direct sur la PL des NPs, point que nous avons également vérifié en déposant des NPs sur une lamelle en l'absence de cellules. De plus, ce contrôle est intéressant du point de vue pratique car il permet sur une seule séquence d'images d'observer l'effet d'un agent tel que l'ET-1 à la fois à l'intérieur de la cellule et à l'extérieur de la cellule. L'approche de détection de NPs uniques est dans ce cas nécessaire pour réaliser ce type de contrôle. Ce contrôle montre que le recouvrement est lié à la présence de ROS intracellulaire et non à celle de ROS dans tout le support.

La troisième expérience de contrôle concerne l'inhibition de la NADPH oxydase qui est la principale responsable de la production de ROS dans les cellules vasculaires.^[95] Cette enzyme a été inhibée avec de l'apocynine qui inhibe l'association des sous-unités cytosoliques et membranaires de la NADPH oxydase, responsable de son activité catalytique (100 μM , incubation d'une demi-heure avant observation en microscopie). Sur trois cellules, nous n'avons observé aucune augmentation de la PL des NPs. Ceci confirme donc que l'augmentation de la PL suite à une stimulation par l'ET-1 est bien due à la production de ROS.

Bilan expérimental

Ces mesures nous ont permis de décrire, au moins partiellement, la dynamique de production et de consommation de H_2O_2 (équivalent H_2O_2 des ROS en réalité). Immédiatement après l'injection d'ET-1, une production de H_2O_2 s'établit pendant approximativement 75 s et est caractérisée par une concentration produite faible ($<$ quelques μM). Cette concentration diminue rapidement jusqu'à ne plus être détectable par nos senseurs. Ensuite, une deuxième vague de production de H_2O_2 s'établit. Elle intervient 150 s après l'injection de l'ET-1. Une concentration moyenne de $22 \pm 8 \mu\text{M}$ a été alors déterminée et est présente pendant une durée de 150 s. Il est clair cependant que la résolution temporelle de notre senseur n'est pas suffisante pour observer l'établissement de cette concentration. Enfin, à la suite de cette phase de production, la concentration en H_2O_2 diminue jusqu'à ne plus être détectable au bout de 100 s.

Ces premiers résultats sont très encourageants quant à la possibilité de mesurer le H_2O_2 intracellulaire avec ce type de NPs. Nous voulons insister sur le fait que la sensibilité de

nos NPs pourra être améliorée de façon radicale dans les expériences à venir. En effet, ces expériences ont été conduites sur des lamelles en verre à cause de la difficulté à faire pousser les CMLV sur celles en silice ce qui a conduit à une multiplication par 8 du signal de fond lors de l'observation en microscopie. Nous avons récemment pu faire pousser ces cellules sur des lamelles en silice en déposant préalablement une couche de collagène. De plus, les expériences ont été conduites avec un temps d'acquisition court de 200 ms ce qui, compte tenu de la dynamique de recouvrement induite par l'ET-1, n'est pas nécessaire. Ainsi, nous pourrions avoir prochainement un rapport signal à bruit considérablement augmenté ce qui permettra de diminuer le temps nécessaire pour mesurer les pentes de recouvrement et donc la résolution temporelle de ce capteur.

Enfin, une des limitations actuelles est la nécessité de photo-réduire les NPs afin de les transformer en capteur intracellulaire de H_2O_2 . Cette limitation pourra être dépassée compte tenu du fait que nous avons démontré que nous pouvions photo-réduire les NPs dans une cuve à l'aide d'une excitation laser à 466 nm et préalablement à leur introduction cytoplasmique.

Implication biologique du caractère biphasique de la production de ROS

Au delà de la démonstration de faisabilité, cette étude a mis au jour un comportement nouveau de l'effet de l'ET-1 sur les CMLV.

Il est connu depuis quelques années que l'ET-1 induit la production de ROS dans de nombreux types cellulaires et que la NADPH oxydase joue un rôle prédominant dans cette production.^[108] Bou Daou et Srivastava^[109] ont montré notamment que l'ET-1 induisait l'activation de kinases (ERK 1, ERK 2), de la protéine kinase B (PKB) et de la protéine tyrosine kinase 2 (Pyk 2), enzymes essentielles de la croissance et de la prolifération des CMLV, ainsi que la nécessaire médiation des ROS induits par l'ET-1. Ils ont pu mesurer l'évolution temporelle de l'activité de ces kinases (pic à 5 min après l'injection de l'ET-1) mais n'ont toutefois pas mesuré l'évolution temporelle de la concentration en ROS intracellulaires. Les seules études à notre connaissance montrant l'évolution de cette concentration ont été proposées par l'équipe de J.J Chen.^[107;110] Cette équipe a d'abord observé l'effet de l'ET-1 sur la production de ROS dans des cardiomyocytes ainsi que sur l'expression du gène précoce *c-fos*.^[107] Des résultats similaires à ceux sur les CMLV ont été trouvés notamment en termes du récepteur à l'ET-1 impliqué (ET_A) et du rôle de la NADPH oxydase. Notons d'ailleurs qu'une des conclusions de cette étude est que l'ajout de catalase annihile l'effet de l'ET-1 sur la production de ROS.

Dans la mesure où la catalase dégrade spécifiquement le H_2O_2 et non les autres ROS, ceci implique que le principal ROS produit est du H_2O_2 . L'évolution temporelle de la concentration en H_2O_2 mesurée dans cette étude a la forme d'une sigmoïde présentant une saturation 12 mn après l'injection de l'ET-1. Cependant, leur résolution temporelle de 3 mn et l'emploi du DCF rendent impossible toute mesure plus précise de cette évolution et donc l'observation du caractère biphasique révélé dans notre étude. La seconde étude porte sur l'induction du gène de l'ET-1 par la production de ROS induite par l'ET-1 exogène dans des fibroblastes cardiaques.^[110] Des résultats similaires quant à la production de ROS par l'ET-1 ont été trouvés pour ce type cellulaire. Dans ce cas, l'évolution de la concentration en ROS est qualitativement la même que celle obtenue dans les cardiomyocytes à part que la saturation intervient après 30 min. Là encore, l'emploi du DCF et la résolution temporelle, cette fois de 5 min, ne leur permettent pas d'observer des variations rapides de cette concentration.

Nous voudrions faire quelques commentaires sur ces deux études ainsi que sur l'ensemble des études que nous avons pu considérer touchant au mécanisme de production de ROS. Tout d'abord, dans ces études, aucune concentration absolue de H_2O_2 n'est proposée ce qui rend d'autant plus importante la possibilité de les quantifier précisément. De plus, le DCF en l'absence de stimulation par l'ET-1 montre une augmentation substantielle de sa fluorescence, ceci étant particulièrement flagrant dans la seconde étude (75% d'augmentation en 30 min, à comparer aux 300% d'augmentation avec stimulation). Dans notre cas, le signal de PL des NPs sans ajout d'ET-1 n'évolue pas ce qui facilite les quantifications. Le dernier commentaire est que le DCF ne peut pas être réduit ce qui impose une grande prudence quant à l'interprétation de la forme sigmoïdale de l'évolution de la concentration en ROS. Les auteurs associent directement l'évolution de la fluorescence de la DCF avec celle de la concentration en ROS ce qui n'est pas correct. Ceci limite donc la validité de l'utilisation du DCF sur des temps longs.

Le caractère biphasique de la production de ROS peut être rapproché de celui induit par l'angiotensine-II (A-II) mesuré par le groupe de Griendling.^[111] L'A-II est, comme l'ET-1, une hormone vasoactive impliquée dans la contraction, la croissance et la migration des CMLV dans les tissus vasculaires. L'effet de cette hormone passe par l'activation de la NADPH oxydase et la production de ROS associée peut alors transactiver le récepteur de l'EGF de manière similaire ce qui est observé à l'ET-1. Cette équipe a observé une production de ROS d'amplitude faible intervenant juste après l'ajout d'A-II suivie d'une production plus importante et plus lente montrant un maximum après 30 min et pouvant durer plusieurs

heures. L'évolution de la concentration de ROS est montrée dans la figure suivante ainsi que le modèle proposé par Griending *et al* pour expliquer la nature biphasique de cette production.

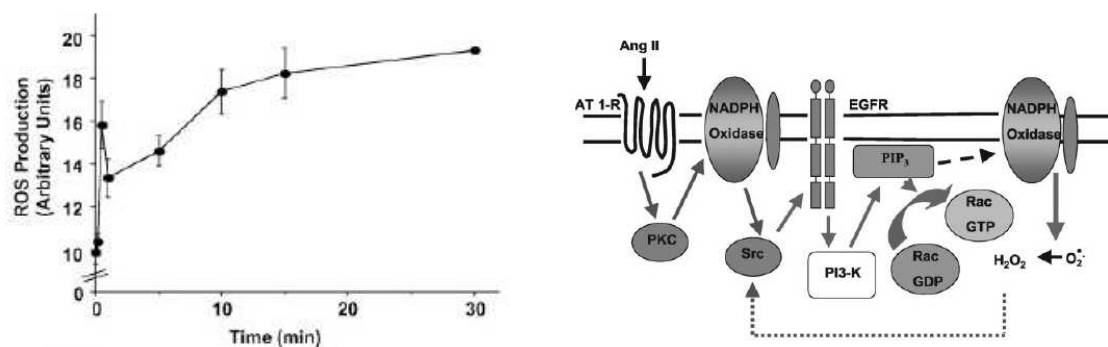


FIG. 6.17 – Gauche : Analyse en cytométrie de flux de la production de ROS par des CMLV à l'aide de la fluorescence du DCF suite à une injection d'A-II. Droite : Modèle proposé pour la production de ROS induite par l'A-II. L'A-II se fixe sur son récepteur induisant une rapide génération de H_2O_2 par l'intermédiaire de l'activation de la protéine kinase C (PKC). Cette production initiale active une tyrosine kinase (Src) aboutissant à la transactivation du récepteur de l'EGF. Cette transactivation induit la formation du phosphatidylinositol triphosphate (PIP_3) par le biais de l'activation de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K). Le PIP_3 provoque alors la transformation du guanine diphosphate (GDP) couplé à la protéine G (Rac). La protéine G peut alors se lier à la NADPH oxydase induisant de nouveau une production de ROS. Cette production stimule de nouveau le Src amplifiant l'activation de la NADPH oxydase. Figures extraites de la référence^[111].

La production initiale de ROS serait alors liée à l'activation rapide de la NADPH oxydase par le biais de la protéine kinase C (PKC) et celle plus lente par l'amplification de l'activité de la tyrosine kinase Src qui induit la transactivation du récepteur de l'EGF qui provoque à son tour l'activation de la NADPH oxydase. Nous utiliserons prochainement différentes méthodes d'inhibition sélective du récepteur de l'EGF pour déterminer le rôle de ce récepteur dans le comportement biphasique que nous observons suite à la stimulation par l'ET-1. Il est enfin intéressant de noter, que sans proposer de quantification précise de la production de ROS, ce groupe assure que les mesures de fluorescence de la DCF se situent dans sa zone de linéarité estimée entre 0.1 et 20 μM (dans notre cas, une concentration de 22 μM a été trouvée).

Enfin, le dernier point restant à préciser concerne l'élimination du H_2O_2 intracellulaire. Une étude intéressante a été proposée par le groupe de Sugita et portait sur l'élimination du H_2O_2 exogène dans des fibroblastes.^[105] Il a été montré que cette élimination engageait les glutathion peroxydases (GPx) localisées essentiellement dans le cytoplasme et les mitochondries et les catalases dans les peroxisomes. La localisation des catalases dans les peroxysomes implique que le H_2O_2 doive franchir la membrane de ce compartiment cellulaire ce qui explique

le phénomène de latence de l'activité des catalases. Chacune de ces enzymes (GPx et catalase) induit des cinétiques de décomposition différentes (type Michaelis-Menten et pseudo ordre 1, respectivement) et permet une adaptation de la réponse cellulaire à des concentrations différentes de H_2O_2 . Le groupe de Sakakura a continué cet effort en proposant un modèle complet de l'élimination du H_2O_2 exogène en tenant compte de la localisation de ces deux enzymes, de leur activité catalytique et des constantes de perméation des différentes membranes.^[112] Ce groupe a pu comparer avec succès leur modèle avec les expériences effectuées sur différents types cellulaires de mammifères (fibroblastes, cellules épithéliales et neuronales). Ils ont conclu que l'effet de latence dû à la compartimentalisation des catalases se retrouvaient dans ces différents types cellulaires. Il est probable que la baisse de concentration observée dans notre étude sur les CMLV implique ces deux enzymes. La stagnation du signal de PL observée après la remontée linéaire pourrait être donc liée à l'activité rapide des peroxidases GPx qui induit une transformation du H_2O_2 rapide. La baisse de PL observée ensuite pourrait être liée alors à l'activité plus lente des catalases.

La diminution du signal de PL après la phase de recouvrement soulève la question peut-être la plus importante de cette étude. En effet, l'équipe de Griendling a démontré que, lors de l'activation de la production de ROS par l'A-II, la seconde phase qui peut durer jusqu'à 6 heures était sûrement la plus importante en ce qui concernait le phénomène de signalisation lié à la croissance cellulaire.^[111] Ainsi, une production de ROS supérieure à ce que peuvent éliminer les catalases entraînerait l'activation du phénomène de croissance sur le long terme. D'autre part, Bou Daou et Srivastava ont montré que l'ET-1 induisait l'activation de kinases essentielles pour la croissance et la prolifération des CMLV. Le pic de phosphorylation de toutes ces kinases intervient seulement 5 min après l'injection de l'ET-1 rendant donc superflue, dans ce contexte, la production de ROS sur le long terme. La question que l'on peut alors se poser est quelle est la dynamique de production de ROS véritablement nécessaire à la correcte signalisation de ces hormones (A-II et ET-1) pour aboutir au processus de croissance. Nous pensons que l'utilisation de ce senseur permettra de répondre à ce type de question.

6.4 Conclusions

Nous avons proposé dans ce chapitre une nouvelle méthode de détection de H_2O_2 à l'aide de NPs uniques. En utilisant la PR des ions Europium trivalents, les NPs ont été préparées dans un état sensible à la présence d'espèces oxydantes. Le recouvrement de PL associé dépend alors de la concentration en H_2O_2 dans une large gamme allant de quelques μM à quelques mM. Les principaux facteurs influençant ce recouvrement ont été déterminés et notamment l'effet de l'intensité incidente sur la dynamique de recouvrement. Nous pensons que l'élaboration d'un modèle complet décrivant l'effet des ROS sur la PL des NPs serait un avantage indéniable quant à l'utilisation et l'optimisation notamment de la dynamique de recouvrement de ce type de senseur. En guise de première application, nous avons étudié la production de ROS induite par l'ET-1 : un comportement original et biphasique a été observé lors de cette production. Ces résultats prometteurs doivent être associés à des mesures complémentaires portant sur la réactivité de ce type de senseur vis à vis d'autres oxydants et sur l'origine de ce comportement biphasique. Nous pensons enfin que de coupler le ciblage d'enzymes impliqués dans la production de ROS à temps de vie court comme l'ion superoxyde par le biais de fonctionnalisations de NP adaptées et la détection locale de ROS pourrait être une application importante de ce type de senseur.

Chapitre 7

Suivi de toxines ε individuelles en nanoparticules de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$

7.1 Introduction

Ce dernier chapitre est consacré à l'étude du mode d'action de la toxine ε à l'aide du suivi de NPs uniques couplées aux toxines.

L'activité de cette toxine passe tout d'abord par la reconnaissance d'un récepteur membranaire localisé dans des microdomaines lipidiques de certaines cellules sensibles telles que les cellules rénales de chien (MDCK, Madin-Darby canine kidney). A la suite d'un processus d'oligomérisation, 7 toxines ε forment un pore dans la membrane cellulaire aboutissant à une fuite rapide d'ions du milieu intracellulaire et à la mort cellulaire. Nous souhaitons suivre dans cette étude l'évolution spatio-temporelle des récepteurs de la toxine ε ainsi que le processus d'oligomérisation.

La technique utilisée pour réaliser cette étude consiste au marquage de la toxine ε par les NPs fluorescentes de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$ associée au suivi par l'intermédiaire de NPs uniques (single particle tracking, SPT) des mouvements de la toxine ε .

Cette étude s'inscrit donc à la fois dans la démonstration de la faisabilité d'un suivi de protéines à l'aide de nos NPs, dans le contexte de l'activité spécifique de la toxine ε ainsi que dans le domaine actuellement controversé de l'existence, de la nature et de l'utilité biologique des compartimentalisations membranaires sous forme de microdomaines. Nous montrerons les premiers résultats obtenus portant sur la dynamique du récepteur de la toxine ε ainsi que

ceux portant sur l'oligomérisation.

Dans cette introduction, nous détaillerons tout d'abord les différents processus associés à l'activité délétère de cette toxine en employant notamment les résultats obtenus par d'autres groupes portant sur la localisation du récepteur dans des microdomaines membranaires et sur le mode d'action de cette toxine. Nous aborderons ensuite la présentation de la technique de SPT en soulignant les différents paramètres qui peuvent être obtenus par cette technique. Ce travail de recherche a été effectué en collaboration avec l'équipe de M. R. Popoff de l'unité bactéries anaérobies et toxines à l'institut Pasteur.

7.1.1 Contexte biologique

Activité toxique chez les animaux

La toxine ε est la responsable essentielle de la virulence de *Clostridium perfringens* type B ou D. Ce microorganisme peut provoquer une entérotoxémie mortelle *i. e.* une maladie causée par la prolifération anormale de *Clostridium perfringens* dans les intestins des agneaux, chèvres et plus rarement des bovins. Cette prolifération induit une production accrue de toxine ε qui peut être absorbée par les muqueuses intestinales et diffuser dans l'ensemble des organes pouvant aboutir notamment à une nécrose du rein et à un gonflement du foie^[113;114] et plus généralement à une hémorragie et à un oedème dans le cerveau, le coeur, les poumons, le foie et les reins de ces animaux.^[115] Il a été montré que cette toxine pouvait aussi s'accumuler dans le cerveau des rats.^[116]

Types cellulaires sensibles

Parmi les types cellulaires initialement étudiés, les MDCK ont montré une sensibilité importante à la toxine ε . Récemment, Shortt *et al*^[117] ont identifié un autre type cellulaire (G-402), d'origine humaine cette fois, sensible à cette toxine. Plus récemment, Soler-Jover *et al*^[118] ont démontré qu'une injection, dans une souris modèle, d'une protéine fusion toxine ε -GFP (Green Fluorescent Protein, GFP)) causait non seulement un oedème et l'accumulation des toxines dans le cerveau mais aussi que cette toxine avait une activité toxique sur les cellules gliales (astrocytes et microglies).^[119]

Mode d'action

Au niveau cellulaire, le mode d'action de la toxine ε a été initialement étudié par l'équipe de Popoff puis par celle de Sakurai.^[120;121] En associant marquage radioactif de la toxine ε par l'iode 125 et la technique de SDS-PAGE ainsi qu'en étudiant sa cytotoxicité, ils ont pu démontrer que l'activité de cette toxine requiert la formation d'un oligomère de toxine au niveau de la membrane des MDCK. Plus précisément, cette toxine est reconnue par la partie extracellulaire d'un récepteur, non encore identifié, puis le processus d'oligomérisation se déclenche. La forme inactive de cette toxine (proto-toxine ε) est reconnue par le même récepteur que la forme activée (toxine ε) qui résulte de la protéolyse d'un peptide en C-terminal et en N-terminal de la proto-toxine ε . Il a été observé que la forme inactive ne peut toutefois pas former d'oligomère ni être cytotoxique ce qui a démontré la nécessaire implication de l'oligomérisation dans la cytotoxicité de la forme activée de cette toxine.^[121] Notons que cette toxine n'est à aucun moment internalisée et que l'oligomérisation dépend nettement de la température contrairement à ce qui a été observé pour la reconnaissance de la toxine par son récepteur. De plus, ces auteurs ont pu montrer que l'oligomérisation aboutissait à une fuite du milieu intracellulaire d'ions Potassium ce qui les a conduit à proposer que la toxine epsilon induisait la formation d'un pore à travers lequel ces ions peuvent passer. L'équipe de M. Popoff confirma l'apparition de ce canal à ions dans une membrane artificielle.^[122] Ils trouvèrent de plus que ce canal permet aussi le passage d'autres ions tels que Cl^- et Na^+ , un des résultats essentiels étant alors que le mécanisme toxique principal est lié à la formation de ce pore. Ensuite, Miyata *et al*^[123] ont montré dans les synaptosomes que l'oligomérisation correspondait à une heptamérisation de la toxine ε .

La toxine ε s'inscrit ainsi de part ces propriétés dans la classe générale des toxines formant des pores qui incluent notamment l'aérolysine, la toxine α de *Clostridium septicum*, la toxine δ du *Bacillus Thuringiensis*, la toxine α du staphylocoque et la toxine de l'anthrax.^[123] D'ailleurs, la structure tridimensionnelle de la toxine ε a été déterminée par diffraction des rayons X et montre une structure allongée ($\approx 10 \text{ nm} \times 2 \text{ nm} \times 2 \text{ nm}$) constituée principalement de feuillets β et de nombreuses similitudes avec la structure de l'aérolysine.^[124] Dans la mesure où ces toxines s'insèrent dans la membrane sans l'aide d'autres protéines ou de la machinerie de translocation, leur changement de conformation lors de l'insertion a été proposé comme un nouveau moyen d'étude des interactions entre protéines et membrane.^[123]

Généralités sur la compartimentalisation membranaire

La toxine ε a de plus attiré l'attention par la localisation de son récepteur et de son activité toxique dans des microdomaines lipidiques.^[125]

Depuis les années 70 et les travaux de Singer et Nicholson,^[126] la bicouche lipidique de la membrane cellulaire était vue comme une "mosaïque fluide" dans laquelle les protéines membranaires, réparties de manière homogène, peuvent se mouvoir librement (diffusion brownienne). Récemment, d'autres modèles sont venus affiner cette représentation.

•Radeaux lipidiques

Les travaux de Simons, van Meer et Ikonen, notamment, ont permis de donner une vision plus subtile dans laquelle la bicouche lipidique est parsemée de microdomaines constitués essentiellement de cholestérol et de sphingolipides agrégés.^[124;127] Ces microdomaines ou radeaux lipidiques ont été conceptualisés initialement comme une solution au problème biologique particulier de la délivrance spécifique de lipides à la face apicale et baso-latérale des cellules endothéliales polarisées.^[128] En effet, la membrane apicale est enrichie par rapport à la membrane baso-latérale en glycosphingolipides qui s'ordonnent grâce à des liaisons hydrogène sous la forme d'agrégats, cette forme autorisant le piégeage de quelques protéines dans le domaine. Le concept de microdomaine est né de ces premières observations. De plus, des protéines spécifiques ancrées dans la membrane via un glycosylphosphatidylinositol (GPI) ont été retrouvées en abondance dans la face apicale des cellules épithéliales. La polarité de localisation observée pour ces glycosphingolipides et ces protéines ancrées a alors amené à penser que ces deux molécules membranaires transitaient par le même microdomaine et étaient adressées spécifiquement du complexe de Golgi à la face apicale de ces cellules. Enfin, d'autres études ont montré que les sphingolipides et les protéines ancrées par le GPI sont insolubles dans un détergent, le triton X-100, à 4°C tout spécialement lorsque du cholestérol est présent. Ceci est devenu la véritable définition opérationnelle des radeaux lipidiques à savoir qu'ils sont insolubles dans le triton. Cette définition est en général complétée par le critère suivant : le caractère résistant au détergent doit disparaître lorsque le cholestérol est enlevé par de la méthyl- β -cyclodextrine. On les qualifie ainsi de membranes résistantes aux détergents (DRM, detergent resistant membrane). Toute protéine incluse dans la partie insoluble sera donc considérée comme appartenant au radeau lipidique avant extraction par le détergent. Ce concept a ensuite rapidement diffusé et a été utilisé notamment dans la régulation de la

polarité cellulaire, du trafic de protéines et de la transduction des signaux. Ce concept est cependant largement débattu et controversé en raison notamment de mesures incohérentes de taille et de temps de vie des domaines.^[128] Selon les études et la méthode de détection utilisée, la taille des radeaux varie de quelques dizaines de nm à plusieurs centaines de nm. Des domaines de 700 nm ont été trouvées et correspondent certainement à des agrégats de radeaux par exemple dans des cavéoles.^[127] Nous montrons un schéma explicatif, extrait de la référence^[127], du rôle des radeaux lipidiques dans la création des cavéoles, du bourgeonnement de certains virus et de la réponse immunitaire.

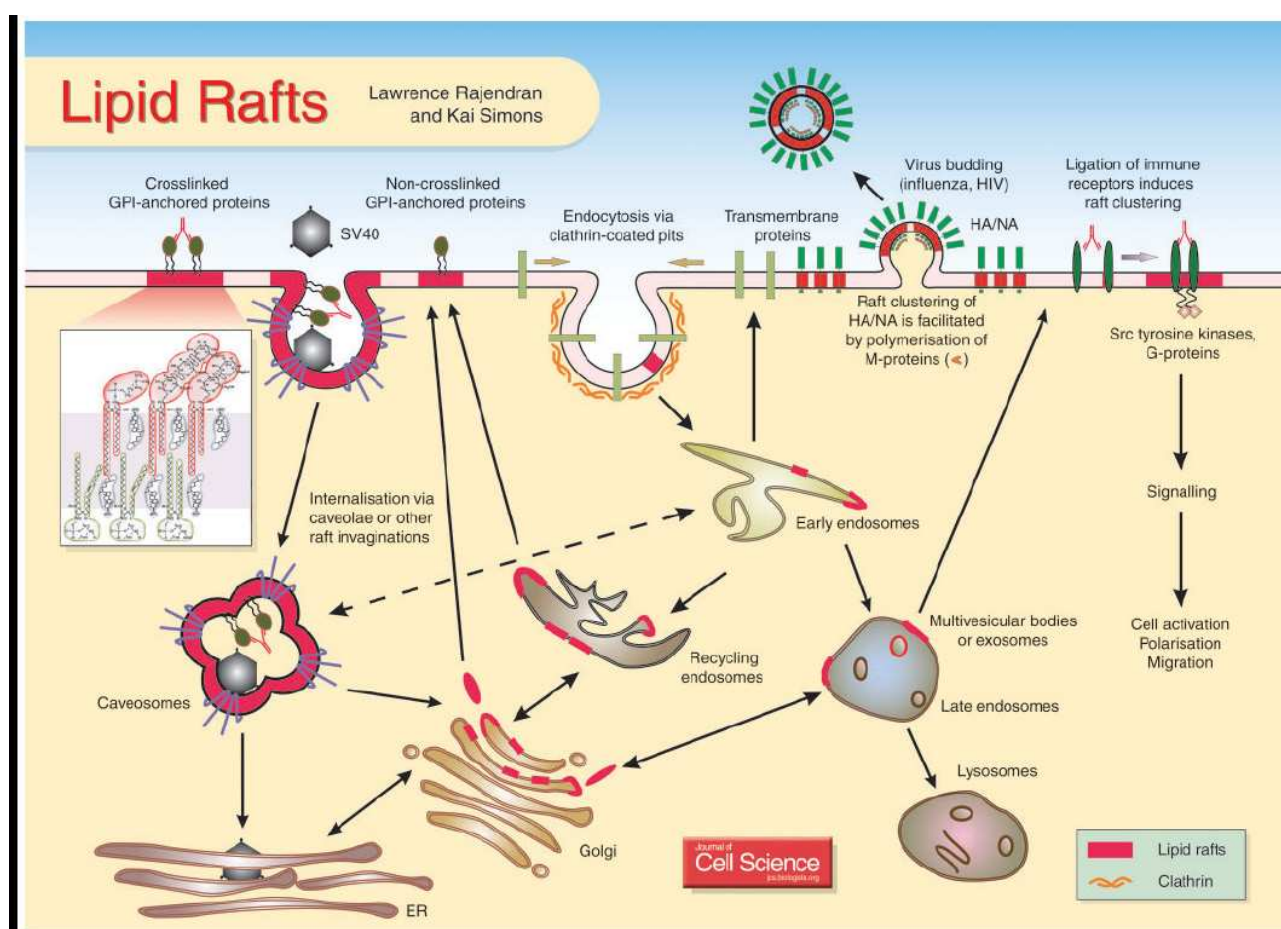


FIG. 7.1 – Modèle du radeau lipidique et de son implication dans certains processus de signalisation. Schéma extrait de la référence^[127].

•Modèles basés sur l'effet du squelette membranaire d'actine

Pour expliquer la compartimentalisation de certaines protéines ou lipides membranaires, une autre approche a été utilisée.^[129] Elle se base essentiellement sur le fait que la mem-

brane cellulaire interagit avec le cytosquelette. Deux modèles ont été proposés par l'équipe de Kusumi.^[130] Dans le cadre du modèle des "haies" ("membrane-skeleton fence model"), la partie cytoplasmique des protéines transmembranaires peut rencontrer (ou percuter) le squelette d'actine situé sous la membrane ce qui induit un confinement transitoire de ces protéines. De plus, ces protéines peuvent s'échapper de ces domaines ("hopping") lors de fluctuations thermiques de la structure du squelette d'actine ou lors du processus de polymérisation/dépolymérisation de l'actine. Il est important de souligner que ce modèle ne s'applique qu'aux protéines transmembranaires.^[130] En revanche, le second modèle dit des "piquets" ("Anchored-Transmembrane Protein pickets") s'applique à toutes les molécules membranaires. Cette fois ce sont les protéines transmembranaires, ancrées et alignées le long du squelette membranaire (les haies précédentes), qui agissent comme des piquets créant par effet stérique et par effet de friction un confinement transitoire des molécules situées à l'intérieur d'une zone définie par ses piquets. Un schéma de ces deux modèles est proposé ci dessous et est issu de la référence^[130].

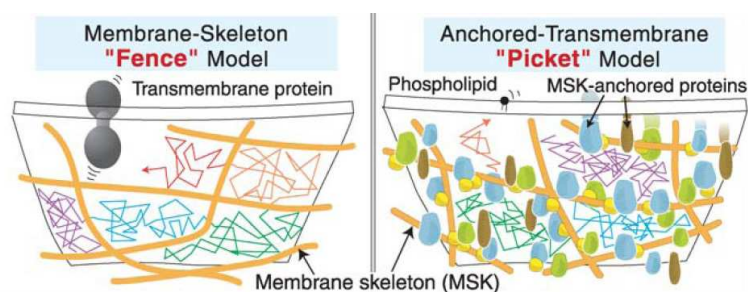


FIG. 7.2 – Modèles des "haies" et des "piquets" permettant de rendre compte de la compartimentalisation des protéines transmembranaires (gauche) et des molécules membranaires (droite). Schéma extrait de la référence^[130].

Ces modèles, radeau lipidique et haies/piquets, ont été souvent opposés mais il semble à présent qu'ils décrivent des mécanismes de compartimentalisation complémentaires.^[131] En tout cas, ces modèles permettent d'apporter un regard nouveau sur le ralentissement allant de 5 à 50 des mouvements de molécules membranaires obtenues dans des membranes naturelles par rapport à celles artificielles et qui a d'ailleurs été à l'origine de ces recherches sur la compartimentalisation. En effet, quel que soit le modèle considéré, les protéines membranaires ne sont pas dans un milieu homogène comme dans le cas des membranes artificielles ce qui induit une diminution de leur constante de diffusion.

Reconnaissance et oligomérisation de la toxine ε dans des DRMs

Dans le cas de la toxine ε , l'équipe de Miyata^[125] a montré que son activité se déroulait essentiellement dans des DRMs de MDCK et de synaptosomes de rats.

Pour ce faire, ils ont utilisé les deux méthodes mentionnées précédemment : l'extraction de la membrane cellulaire par le triton X-100 à 4°C et le retrait du cholestérol par la méthyl- β -cyclodextrine. Ils ont pu démontrer tout d'abord que la reconnaissance de la toxine ε ou de la proto-toxine ε se faisait uniquement dans les DRMs. Ceci conduit à penser que le récepteur toujours non identifié à l'heure actuelle est localisé dans un DRM. Ensuite, ils ont montré que l'heptamère de toxine ε se retrouve uniquement dans les DRMs. Ils ont d'ailleurs confirmé cette analyse en marquant les DRM grâce à un marquage de la cavéoline-1 et en observant que l'heptamère et la cavéoline se retrouvait dans la même phase insoluble (DRM). Enfin, il a été observé que l'ensemble du processus d'oligomérisation se déroulait dans les DRMs en observant notamment l'effet au cours du temps du traitement avec la méthyl- β -cyclodextrine sur l'héptamérisation. Ces résultats amènent donc à une représentation claire de l'activité toxique de la toxine ε : la reconnaissance, l'oligomérisation et la formation du pore déclenchant la mort cellulaire se déroule dans des DRMs. Les auteurs émettent l'hypothèse que tout le processus se déroule dans un unique DRM et qu'en fin de compte la toxine ε utilise la stratégie la plus simple dans laquelle le microdomaine joue le rôle de concentrateur de l'effet toxique.^[125] Un des buts de notre étude à l'aide de NPs uniques portera justement sur l'unicité de ce DRM.

7.1.2 Technique du suivi de NPs uniques

Nous abordons à présent une brève introduction à la technique de suivi en NPs uniques (SPT).

Principe et avantage du SPT

Les premiers travaux portant sur le suivi de biomolécules individuelles à l'aide d'un marqueur fluorescent datent du début des années 80 et ont été réalisés par Barak et Webb.^[132] D'autres méthodes de détection ont été proposées depuis avec notamment l'utilisation de la "nanovid microscopy" sur des NPs d'or. Cette technique se base sur la diffraction Rayleigh de la lumière sur des NPs d'or. Ces NPs d'une taille, d , allant de 40 nm à 100 nm sont accrochées

à la biomolécule d'intérêt et le signal diffracté et donc le mouvement de la biomolécule sont enregistrés à l'aide d'une caméra. Le signal diffracté étant proportionnel à d^6 , des NPs d'une taille de quelques dizaines de nm permettent une cadence d'acquisition des images élevée qui est de façon routinière celle d'une vidéo standard (30 images/s).^[133] A l'aide d'un prototype de caméra CMOS, l'équipe de Kusumi a obtenu des cadences allant jusqu'à 40000 images par seconde.^[130]

Les principaux concepts de SPT, utilisés par la suite pour d'autres marqueurs tels que les Quantum Dots ou nos NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}$, ont été proposés dans le cadre des NPs d'or.

La technique de SPT permet une visualisation directe et précise de la trajectoire de chaque biomolécule. Contrairement aux autres techniques, FCS et FRAP que l'on présentera par la suite, elle permet de s'affranchir complètement des effets de moyenne et de mesurer les hétérogénéités de mouvement entre les différentes biomolécules et celles temporelles pour chaque biomolécule. Elle permet par ailleurs de connaître la position de chaque NP avec une précision bien inférieure à la limite par diffraction. En effet, pour un objet dont la taille est inférieure à la longueur d'onde, son image obtenue par un microscope sera une figure d'Airy dont la largeur est déterminée par la longueur d'onde d'observation (typiquement de quelques centaines de nanomètres). Deux objets dont les positions sont distantes d'une valeur inférieure à cette largeur ne pourront pas être résolus (critère de Rayleigh). En revanche lorsque les objets, en l'occurrence des NPs, sont bien séparés les uns des autres chaque spot de diffraction peut être ajusté par une fonction d'Airy pour déterminer sa position ce qui permet une localisation bien plus précise que ce qu'autorise normalement le critère de Rayleigh. La précision du pointé va dépendre du nombre de photons émis ou diffractés par la NP et est typiquement proche d'une dizaine de nm. L'approche SPT permet donc d'avoir une résolution spatiale extrêmement précise.^[133]

Types de mouvement révélés par SPT

Cette technique permet aussi de classer les trajectoires des biomolécules marquées selon la nature de la diffusion. L'équipe de Kusumi a proposé en 1993 d'utiliser le déplacement quadratique moyen (MSD, mean square displacement) calculé pour chaque trajectoire de NPs individuelles afin de distinguer les mouvements de type purement brownien, dirigé et confiné.^[134] D'autres techniques de séparation des trajectoires existent et sont résumées dans la revue proposé par Saxton.^[133]

La définition du MSD pour un mouvement en deux dimensions (x,y) est donnée par :

$$MSD(\Delta t_n) = MSD(n\delta t) = MSD_x(n\delta t) + MSD_y(n\delta t) \quad (7.1)$$

$$= \frac{1}{N-1-n} \sum_{j=1}^{N-1-n} (x(j\delta t + n\delta t) - x(j\delta t))^2 + (y(j\delta t + n\delta t) - y(j\delta t))^2 \quad (7.2)$$

où δt représente l'intervalle de temps entre chaque image et N le nombre total d'images.

A chaque type de mouvement est associé une forme particulière du MSD exprimé en fonction du temps écoulé Δt_n . Nous avons extrait de l'article de Kusumi la figure suivante montrant la forme du MSD pour les mouvements browniens (a), dirigé (b) et confiné (c).

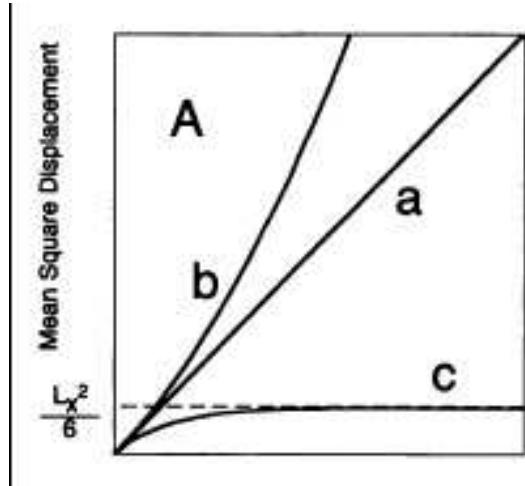


FIG. 7.3 – Forme du MSD en fonction de Δt d'une NP pour un mouvement dans une dimension de type brownien (a), dirigé (b) ou confiné (c). Figure extraite de la référence^[134].

Pour un mouvement purement brownien, le MSD dépend linéairement du temps et vaut $4D\Delta t$, avec D le coefficient de diffusion.

Pour un mouvement dirigé, le MSD vaut : $4D\Delta t + v^2(\Delta t)^2$ où v représente une vitesse constante de dérive associée au processus dirigé.

Enfin, pour un mouvement confiné, le MSD vaut : $\langle r_c^2 \rangle (1 - A_1 \exp(-4A_2 D t / \langle r_c^2 \rangle))$ où r_c est la taille du microdomaine et A_1 et A_2 dépendent de la géométrie du domaine.^[133] Il est important de souligner que cette formulation du MSD résulte d'hypothèses sur la nature du confinement notamment la présence d'une barrière d'énergie infinie et n'est qu'une approximation de la formulation sous la forme de série d'exponentielles donnée par Kusumi et Saxton.^[134] Nous utiliserons dans la suite une autre formulation du MSD pour l'étude de la toxine ε .

Types de marqueur utilisé en SPT

La technique de SPT a initialement utilisé des NPs d'or et des billes de latex fluorescentes comme marqueurs. Les principaux avantages résident dans la résolution temporelle et spatiale qu'ils permettent d'obtenir ainsi que dans l'absence de photoblanchiment. Le principal désavantage de ces marqueurs est leur taille (40 à 100 nm) ce qui peut influencer la dynamique de la biomolécule d'intérêt spécialement dans des milieux confinés.

Des fluorophores organiques ou des protéines fluorescentes ont également été utilisées. Ces deux types de marqueurs ont une taille réduite (qq nm). Les protéines fluorescentes permettent de plus d'obtenir une stoechiométrie 1 :1 entre le marqueur et la protéine ciblée. Cependant, leur photoblanchiment rapide (qq s) ne permet pas d'enregistrer des trajectoires longues.

En 2002, l'utilisation de QDs pour le suivi des récepteurs de glycine a élargi les possibilités de cette technique.^[15] Le bon rapport signal à bruit des QDs a permis d'obtenir une résolution temporelle de 75 ms et une résolution spatiale de 8 nm ce qui est assez proche de celles obtenue en "nanovid microscopy" classique. Le rayon hydrodynamique plus faible des QDs (20-25 nm) ainsi que la possibilité d'utiliser des QDs émettant à des longueurs d'onde d'émission différentes afin de suivre plusieurs biomolécules en même temps sont leurs principaux avantages. En revanche, le clignotement de leur émission est une difficulté importante pour reconstituer des trajectoires longues.

Plus récemment, une nouvelle technique de détection de NPs uniques a été proposée par l'équipe de B. Lounis.^[135] Cette technique est basée sur l'augmentation de température induite par l'absorption laser de NPs d'or à la résonance plasma et provoquant une modification locale de l'indice de réfraction du milieu. Cette modification est ensuite détectée par contraste d'interférence à l'aide d'un second laser. Cette méthode photo-thermique a permis de détecter récemment des NPs d'or de 5 nm et de suivre les récepteurs AMPA marqués par ces NPs dans des cellules vivantes.^[136] Cependant, deux limitations de cette technique sont à considérer. Pour générer la modification d'indice de réfraction, des intensités très importantes sont nécessaires, de l'ordre de 400 kW.cm^{-2} ce qui est deux ordres de grandeur supérieure à ce qui est classiquement utilisé en microscopie de fluorescence. Selon le type cellulaire étudié, ces intensités peuvent être néfastes. De plus, la détection ne se fait pas avec une illumination en plein champ mais avec une forte focalisation ce qui limite soit la résolution temporelle soit le nombre de NPs pouvant être observées simultanément. Ce groupe a cependant proposé une

méthode de triangulation pour la prédiction de la position des NPs permettant d'aboutir à une résolution temporelle de 33 ms pour le suivi d'une NP unique.^[136]

Autres techniques pour l'investigation de la dynamique des membranes

Deux autres techniques sont aussi utilisées pour révéler le comportement dynamique de molécules membranaires.

La première est connu sous l'acronyme de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching). Elle utilise le fait que les marqueurs fluorescents perdent leur capacité d'émettre des photons après une répétition trop importante des cycles d'excitation et d'émission. Un flash laser intense et localisé permet alors de photoblanchir rapidement les fluorophores marquant la biomolécule d'intérêt. Le mouvement diffusif des biomolécules situés initialement dans des zones non-photoblanchies permet alors de repeupler la zone photoblanchie en espèces fluorescentes. La dynamique de ce repeuplement, suivie à faible intensité laser, permet de déterminer les constantes de diffusion ainsi que la fraction mobile de ces fluorophores. Cette technique bien que simple à mettre en oeuvre souffre cependant de plusieurs limitations liées principalement à des artefacts de mesure et à une faible résolution spatiale.^[131;137]

La deuxième technique est connue elle aussi par son acronyme FCS (Fluorescence correlation spectroscopy). Cette technique est basée sur les fluctuations d'intensité de fluorescence associées au passage de biomolécules marquées dans un volume d'observation limité par diffraction.^[131] Chaque bouffée de photons sera liée au passage de chaque biomolécule marquée. La fonction d'autocorrélation de ce signal de fluorescence permet alors de calculer le temps moyen de diffusion nécessaire pour qu'une molécule passe à travers le volume d'observation. Dans sa forme standard, elle n'est que peu sensible aux molécules diffusant lentement et possède une résolution spatiale faible par rapport à la SPT. Ces trois techniques (SPT, FRAP, FCS) sont comparées et commentées plus en détail dans un article récent proposé par Marquet *et al.*^[131]

7.2 Suivi de la dynamique membranaire de la toxine ε

Nous exposons dans cette section les premiers résultats obtenus récemment concernant le suivi des NPs uniques couplées aux toxines ε .

7.2.1 Couplage des NPs aux toxines ε

La méthode de couplage a été présentée au chapitre 5. Nous résumons dans la suite les principales caractéristiques de ce couplage. Nous avons réalisé plusieurs couplages dont deux nous ont servi pour les expériences de microscopie.

Le couplage est réalisé à partir de la réaction entre les fonctions esters activées du cross-linker (BS^3) préalablement accroché aux NPs et les fonctions amines de la toxine ε . Le premier couplage s'est déroulé pendant 4 heures à température ambiante dans une solution contenant $0.65 \mu\text{M}$ de NPs et $56 \mu\text{M}$ de toxine. Après plusieurs centrifugations qui servent à séparer les NPs couplées des toxines libres, le culot est redispersé dans du tampon phosphate, l'essentiel de la solution de NPs couplées est alors conservé à -80°C . Une partie de cette solution est analysée par le test BCA afin de déterminer la concentration en toxines couplées aux NPs. Nous avons trouvé que 46 % de la concentration en toxines initiale est couplée aux NPs. Ceci implique que chaque NP est couplée en moyenne à 40 toxines. Le second couplage utilisé met en jeu initialement une solution contenant $0.35 \mu\text{M}$ de NPs et $5.3 \mu\text{M}$ de toxine. Pour cette réaction, nous avons obtenu 100% de couplage et 15 toxines par NP. Dans ce second couplage, nous avons rajouté du PEG 27 dans le mélange réactionnel (cf. chap. 5).

Ces deux couplages aboutissent à un nombre élevé de toxines par NP. Nous souhaitons préciser qu'il résulte essentiellement d'une erreur commise au départ sur la concentration initiale en toxine. D'autres couplages seront réalisés prochainement afin d'obtenir une stoechiométrie NP-toxine proche de 1 :1. Notons cependant que nous avons montré dans le chapitre 5^[27] que le nombre moyen de protéines par NP ne correspond pas réellement au pic de la distribution du nombre de protéines par NP. Ainsi, il est probable qu'un grand nombre de NPs soient couplées à un nombre de toxines plus faible que les nombres avancés précédemment (40 et 15).

7.2.2 Préparation des cellules MDCK

Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (Gibco) complété avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et un antibiotique et un antimycotique (milieu complet) et repiquée tous les 4 jours à une concentration de 1×10^5 cellules par ml dans des boîtes de culture de surface 25 cm^2 . Un à deux jours avant l'expérience de microscopie les cellules sont trypsinées puis déposées sur des lamelles en verre dans le milieu complet et placées dans une

étuve à 37°.

Afin d'éviter une oligomérisation des toxines non-contrôlée, nous utilisons le résultat de l'équipe de M. Popoff portant sur l'inactivation de l'oligomérisation à basse température.^[120] Le jour de l'expérience et après avoir remplacé le milieu de culture par du milieu HBSS (Gibco), nous mettons les lamelles avec les cellules dans le support de microscopie à 4°C pendant 10 min. Ensuite, nous rajoutons dans le support les toxines marquées. Cette solution est constitué en outre de milieu HBSS préalablement refroidi à 4°C et de 0.1% de SVF afin d'éviter les interactions non-spécifiques. La concentration en NPs dans le support est typiquement de l'ordre de 50 nM. Pour les expériences de microscopie nous avons sélectionné par des centrifugations les tailles de NPs autour de 30 nm. Au bout de 30 min, nous rinçons plusieurs fois avec du milieu HBSS les toxines qui ne se sont pas accrochées aux membranes des cellules. Le support est ensuite placé sur la platine chauffante du microscope. Les expériences de suivi sont ensuite conduites soit à température ambiante soit à 37°C(± 0.1).

7.2.3 Dispositif expérimental et précision de la localisation

Le dispositif optique expérimental est celui présenté au chapitre 1. Nous avons toutefois enlevé l'afocale devant la CCD afin de réduire l'étalement des photons émis par les NPs sur les pixels de la CCD. L'objectif utilisé est un objectif Zeiss 63X avec une ouverture numérique de 1.4. Chaque pixel correspond à une taille réelle au niveau de la lamelle de 317 nm. La caméra CCD utilisée a un temps de lecture assez important : 170 ms pour une zone observée de 200 par 200 pixels, 70 ms pour 100 par 100, 30 ms pour 50 par 50 et 13 ms pour 20 par 20 pixels. La résolution temporelle de notre suivi est la somme du temps d'acquisition (50 ms ou 100 ms) et du temps de lecture. Cette résolution va donc être considérablement dégradée par le temps de lecture de la caméra.

Le groupe de W.Webb a proposé une formule permettant de calculer la précision de la localisation d'un objet fluorescent de taille bien inférieure à la limite par diffraction (spot).^[138] La variance de l'erreur commise sur la localisation, $\langle (\Delta R)^2 \rangle$, dépend de l'écart-type de la PSF, s , de la taille du pixel, a , du nombre de photon provenant du signal de fond, b , et enfin du nombre total de photons, N , associé à chaque spot de diffraction. La variance de cette erreur s'écrit alors comme :

$$\langle (\Delta R)^2 \rangle = \frac{s^2}{N} + \frac{a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \quad (7.3)$$

Pour 50 ms de temps d'exposition, le nombre moyen de photons détectés ainsi que le paramètre s ont été déterminés sur un ensemble de NPs individuelles triées en taille ($\approx 25\text{-}30$ nm) et valent respectivement 400 ± 300 photons et 300 nm. Le niveau de signal de fond au niveau de la membrane des cellules MDCK déposées sur des lamelles en verre est compris entre 10 et 20. Enfin, le paramètre a vaut 317 nm. Ceci conduit à une résolution spatiale comprise selon le niveau de bruit entre 40 et 75 nm pour 400 photons détectés.

7.2.4 Résultats expérimentaux

Nous abordons d'abord la spécificité de l'accrochage des toxines marquées par les NPs sur la membrane des MDCK. Ensuite, nous montrerons que les toxines marquées conservent leur activité toxique. Enfin, nous étudierons le mouvement des toxines marquées et déterminerons la nature de ce mouvement ainsi que ses principales caractéristiques.

Interaction spécifique entre les toxines marquées et la membrane extracellulaire des MDCK

Nous avons tout d'abord vérifié que l'accrochage des toxines marquées sur la membrane était spécifique. Pour ce faire, les toxines (40 toxines par NP) ont été incubées pendant une demi-heure avec l'anticorps de la toxine ε bloquant la fixation à son récepteur avant d'être rajoutées aux cellules MDCK confluentes et placées à 4°C. Dans les mêmes conditions, des toxines marquées sans anticorps sont introduites dans un autre support et les résultats sont comparés en termes de nombre de NPs accrochées à la membrane des MDCK.

Nous montrons dans la figure suivante : deux images avec (droite) et sans traitement des toxines avec l'anticorps (gauche).

Une quinzaine de champ de vue a été imagée pour chaque condition. Chaque champ correspond à un nombre de cellules compris entre 2 et 3. Nous n'avons pas observé de NP accrochées à la membrane dans le cas de la préincubation avec l'anticorps. En revanche, lorsque les toxines marquées n'ont pas été inactivées par l'anticorps nous obtenons en moyenne une vingtaine de NPs accrochées par région. Ceci indique que l'accrochage des toxines à la membrane est spécifique. De plus, cela montre que dans le cas de ce couplage (40 toxines par NP) les interactions non-spécifiques entre notamment la surface de la NP et la membrane des MDCK sont faibles.

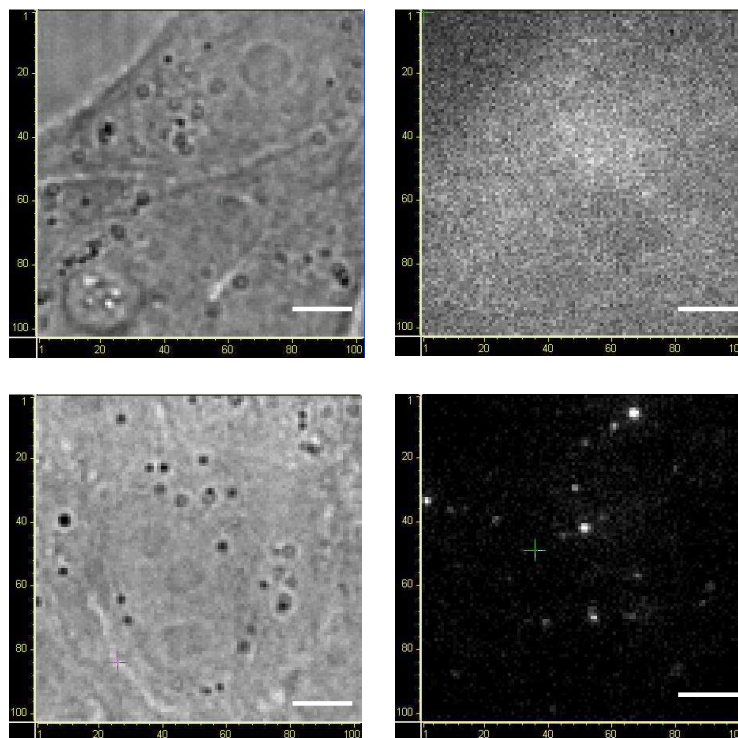


FIG. 7.4 – Accrochage spécifique des toxines marquées par les NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}$. En haut : image en lumière blanche (gauche) et image en fluorescence (droite) de la même région pour des toxines incubées avec l'anticorps spécifique de la toxine ε . En bas : idem mais sans incubation avec l'anticorps. Excitation : 466 nm, détection : 617 nm, $I_{inc}=3\text{-}5 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp}=50 \text{ ms}$, $T_{lecture}=70 \text{ ms}$, $T=21^\circ\text{C}$. Echelle $6 \mu\text{m}$.

Conservation de l'activité de la toxine après couplage avec les NPs

Des tests de toxicité de la toxine marquée ont été réalisés à l'institut pasteur par l'équipe de M. Popoff. Le protocole est expliqué dans la référence^[120]. Des tests de cytotoxicité ont été effectués sur les toxines marquées selon le premier couplage (40 toxines par NP) ainsi que sur des NPs-BS³ (sans toxine). Nous avons trouvé pour ce couplage : une concentration en NPs de $0.65 \mu\text{M}$ et une concentration en toxines couplées de $25.9 \mu\text{M}$. La dose minimale toxique de la toxine ε libre est de $0.024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (0.75 nM) alors qu'elle est de $1.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (43 nM) pour la toxine marquée. Après marquage, la toxine ne conserve donc que 1.7% de son activité si on considère que chaque toxine couplée peut participer à l'activité toxique. Nous estimons cependant qu'il est plus pertinent de prendre en compte la concentration en NPs plutôt que celle en toxines dans la mesure où, une fois que l'une des toxines couplées sur une NP interagit avec son récepteur, la grande majorité des autres toxines couplées à cette même NP ne peut plus interagir. Il est cependant possible que deux toxines couplées à une même NP soient suffisamment proches l'une de l'autre et suffisamment bien orientées pour interagir

avec deux récepteurs différents. En tenant compte de ces considérations, nous estimons que la toxine marquée conserve entre 70% et 35% de son activité par rapport à la toxine libre. Nous avons précisé que son activité toxique implique la formation d'un heptamère. Compte tenu de la taille des NPs utilisée dans les tests de cytotoxicité (autour de 18 nm), il semble difficile que 7 toxines appartenant à 7 NPs différentes puissent former cet heptamère. La première explication pourrait provenir du fait qu'essentiellement ce sont les toxines couplées aux NPs de petite taille (10-15 nm) qui sont impliquées dans le processus d'oligomérisation. La seconde explication pourrait être que plusieurs toxines couplées à une même NP participent à ce processus. Ceci pose une sérieuse difficulté quant à l'interprétation des résultats notamment en termes de coefficient de diffusion de la toxine couplée à son récepteur. Pour les prochaines études, nous nous attacherons à obtenir une stoechiométrie 1 :1 et à comparer aussi la dynamique membranaire de la toxine ε à sa forme non-toxique (proto-toxine). Les tests de cytotoxicité effectués sur les NPs sans toxines ont montré que ces NPs n'avaient aucune activité toxique détectable sur les cellules MDCK jusqu'à une concentration en NPs de 0.65 μM .

Mouvement confiné des toxines marquées

Nous voulons savoir à présent quelle est la nature du mouvement de la toxine marquée et fixée à son récepteur. Nous noterons par la suite le complexe formé par la toxine et son récepteur par R-T ε . Nous avons tout d'abord étudié le mouvement du complexe avec une résolution temporelle de 270 ms ($T_{exp}=100$ ms, $T_{lecture}=170$ ms). La figure suivante montre l'image de fluorescence des NPs marquant les R-T ε ainsi que 4 exemples de trajectoire de NPs dans le plan de la membrane (A, B, C, D).

Les trajectoires montrent un caractère confiné avec une taille de domaine de approximativement 400 nm. Sur les quarante trajectoires étudiées, on observe ce même comportement au moins pendant 20 s. Nous observons aussi sur quelques trajectoires un comportement différent marqué par l'apparition de plusieurs sous-régions dans la trajectoire (cf. trajectoire C).

Pour quantifier ce mouvement, nous utilisons le déplacement quadratique moyen (MSD, mean square displacement). Nous étudierons à l'aide de ce MSD des expériences plus récentes effectuées à 37°C et avec une résolution temporelle de 80 ms.

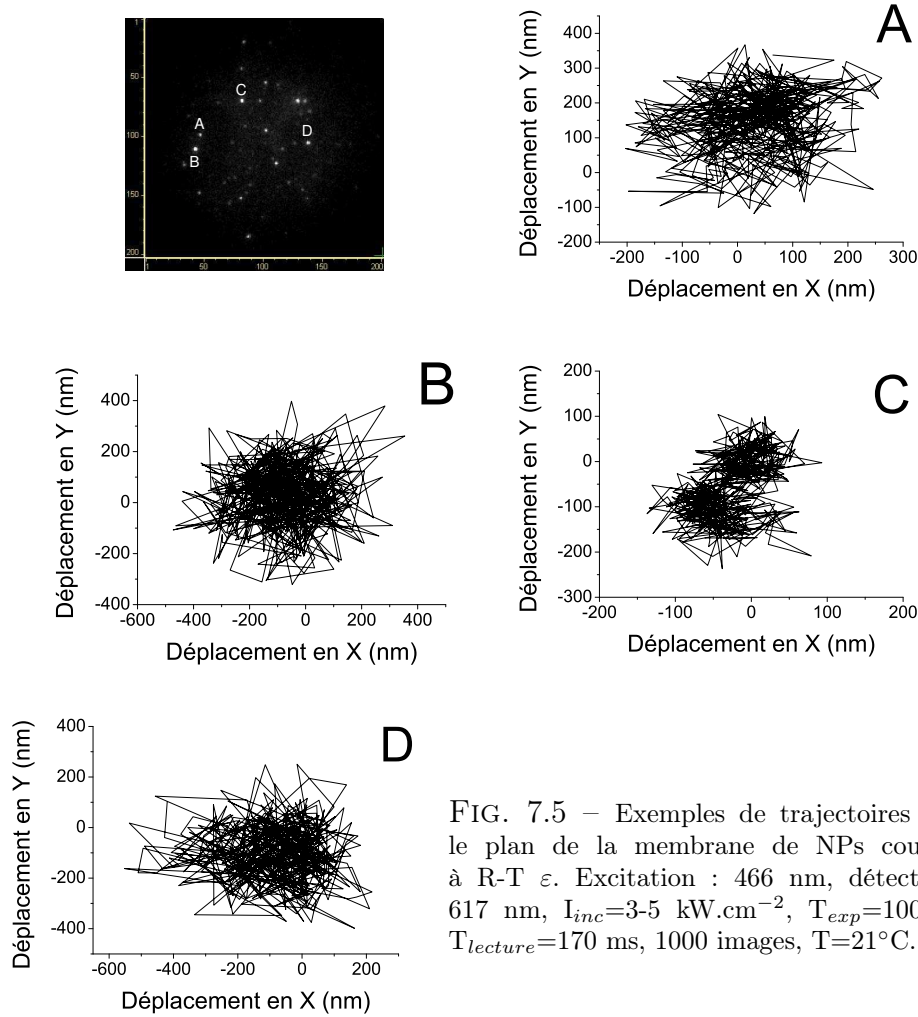


FIG. 7.5 – Exemples de trajectoires dans le plan de la membrane de NPs couplées à R-T ε . Excitation : 466 nm, détection : 617 nm, $I_{inc}=3-5 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp}=100 \text{ ms}$, $T_{lecture}=170 \text{ ms}$, 1000 images, $T=21^\circ\text{C}$.

Détermination des paramètres du confinement

- MSD d'un mouvement confiné

Pour chacun des déplacements $(x(t), y(t))$ des NPs individuelles, les MSD $\langle x^2 \rangle(t)$ et $\langle y^2 \rangle(t)$ sont calculés à partir de l'équation 7.2. Nous ajustons ensuite ce MSD expérimentale par le MSD théorique pour un mouvement confiné.

Nous utilisons principalement le modèle proposé par Kusumi en 1993 pour décrire le MSD d'une particule diffusant librement dans un domaine bidimensionnel confiné par 4 barrières de potentiel infini.^[134] Ce MSD est exprimé sous la forme d'une somme d'une constante reliée à la distance séparant deux barrières dans une direction (L_x , L_y) et d'une série infinie d'exponentielles. Nous ne conservons que les deux premiers termes de la série ce qui s'avère largement suffisant pour décrire le mouvement des NPs. Les deux MSD ($\langle x^2 \rangle(t)$, $\langle y^2 \rangle(t)$)

s'expriment alors comme suit^[134] :

$$\langle x^2 \rangle (t) = \frac{L_x^2}{6} - \frac{16L_x^2}{\pi^4} \left(\exp\left(\frac{1}{2}\left(\frac{\pi\sigma_x}{L_x}\right)^2 t\right) + \exp\left(\frac{1}{2}\left(\frac{3\pi\sigma_x}{L_x}\right)^2 t\right) \right) \quad (7.4)$$

$$\langle y^2 \rangle (t) = \frac{L_y^2}{6} - \frac{16L_y^2}{\pi^4} \left(\exp\left(\frac{1}{2}\left(\frac{\pi\sigma_y}{L_y}\right)^2 t\right) + \exp\left(\frac{1}{2}\left(\frac{3\pi\sigma_y}{L_y}\right)^2 t\right) \right), \quad (7.5)$$

avec $\sigma_x^2 = 2D_x$ et $\sigma_y^2 = 2D_y$ où D_x et D_y représentent les coefficients de diffusion selon les deux directions x et y ($4D = 2D_x + 2D_y$).

Afin de s'affranchir de tout mauvais ajustement des courbes de MSD ou de la nature du mouvement (brownien, confiné, dirigé), il a été proposé pour la détermination du coefficient de diffusion (D) dans le domaine d'ajuster les premiers points expérimentaux par une droite. Dans ce cas, la pente de la droite équivaut à $4D$. Il n'y a cependant pas de consensus sur quels points utiliser. Le groupe de Kusumi utilise le deuxième, troisième et quatrième point des courbes de MSD.^[134] D'autres groupes préfèrent le premier, deuxième et troisième point.^[139] Nous choisissons d'utiliser ce dernier ensemble de points.

Enfin, chaque mesure de position est associée à une certaine incertitude ((ΔR)) dont l'importance dépend du nombre de photons détecté pour chaque NP. Cette incertitude implique que chaque courbe de MSD expérimentale est en fait la somme d'une valeur constante et d'une courbe hypothétique de MSD obtenue dans des conditions où l'incertitude sur la mesure de la position des NPs est nulle. Ainsi, l'ajustement linéaire des premiers points ne conduit pas à une droite d'ordonnée à l'origine nulle. Cette ordonnée non-nulle manifeste donc l'incertitude sur la mesure de la position.^[88;140] et est égale à $4((\Delta R))^2$. Ainsi, pour tenir compte de cet effet, nous soustrairons à chaque courbe de MSD cette valeur constante obtenue grâce à l'ajustement linéaire sur les premiers points. Ceci permet d'estimer avec plus de précision la valeur de la taille du domaine (Cf. éq. 7.4).

- Caractéristiques des microdomaines

Nous appliquons ce traitement à nos données expérimentales. Une résolution temporelle de 80 ms a été choisie ($T_{exp} = 50$ ms, $T_{lecture} = 30$ ms). Le second couplage (15 toxines par NP) a été utilisé afin de limiter les interactions entre les différentes toxines accrochées aux NPs et la membrane. De plus la température est portée 37°C . Ceci a cependant causé une dérive de la platine de translation et limité notre temps d'observation à 20 s. Nous montrons dans la figure suivante deux exemples de MSD pour chaque direction x et y ainsi que les ajustements correspondants (éq. 7.4-5). Comme nous nous y attendions, ces courbes de MSD

sont saturées ce qui implique que nous avons bien à faire à un mouvement confiné. L'accord avec l'ajustement est relativement bon ce qui permet de déduire la taille des domaines. En ajustant par une droite les trois premiers points, le coefficient de diffusion du complexe R-T ε est déterminé. En étudiant le mouvement des NPs sur 15 cellules MDCK, 37 trajectoires ont

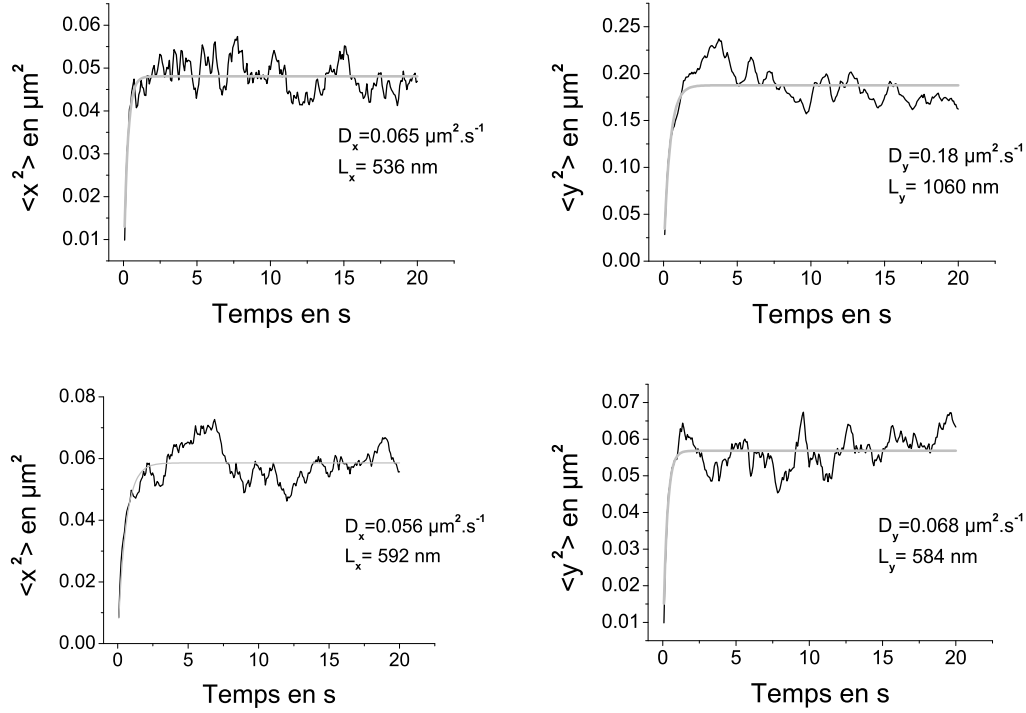


FIG. 7.6 – Exemples de MSD de NPs couplées au complexe R-T ε . Excitation : 466 nm, détection : 617 nm, $I_{inc}=3-5 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp}=50 \text{ ms}$, $T_{lecture}=30 \text{ ms}$, 500 images, Temp= 37°C .

été obtenues dont 8 ne pouvant pas être ajustées par les équations 7.4-5. Pour ces 8 trajectoires, le mouvement ressemble à un mouvement confiné puis dirigé. Il est cependant probable que cet effet soit un artefact dû à une dérive de la platine du microscope et/ou à un mouvement de la cellule. Sur les trajectoires restantes, nous avons appliqué le traitement mentionné plus haut. Les résultats en termes de coefficient de diffusion et de taille des domaines sont indiqués dans le tableau suivant :

| | $D_x (\mu\text{m}^2\text{s}^{-1})$ | $L_x (\text{nm})$ | $D_y (\mu\text{m}^2\text{s}^{-1})$ | $L_y (\text{nm})$ | $D (\mu\text{m}^2\text{s}^{-1})$ | $L (\text{nm})$ |
|-----------|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------|
| Résultats | 0.083 ± 0.047 | 763 ± 342 | 0.099 ± 0.05 | 835 ± 282 | 0.091 ± 0.047 | 799 ± 311 |

FIG. 7.7 – Tableau récapitulant les coefficients de diffusion et la taille des domaines obtenus à partir des résultats des ajustements des courbes de MSD (N=29 NPs). Le taille du domaine L a été calculée par $L=(L_x L_y)^{1/2}$.

Le coefficient de diffusion D déterminé dans cette étude est proche de ceux trouvés dans la littérature pour des récepteurs membranaires présentant un mouvement confiné dans des microdomaines. Par exemple, l'équipe de Kusumi a déterminé un coefficient de diffusion de $\approx 0.1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pour les récepteurs de l' α_2 -macroglobuline et de la transférine.^[129] Un coefficient de diffusion de $0.11 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ a été trouvé pour le mouvement des récepteurs des μ -opioïdes.^[141]

La taille des microdomaines révélée par notre étude se situe plutôt parmi les valeurs importantes des tailles de microdomaines trouvées dans la littérature.^[130;133] Cependant, la détermination de ces tailles peut dépendre de la résolution temporelle du dispositif expérimental.^[129] L'équipe de Kusumi et Jacobson a notamment montré qu'à l'intérieur de chaque trajectoire en apparence confinée pouvaient exister des sous-microdomaines induisant un confinement transitoire du mouvement des récepteurs.^[139] Nous avons observé de manière claire sur certaines trajectoires des sauts de la position des NPs (Cf. Fig. 7.5 C). Ainsi, la taille des microdomaines est peut-être surestimée pour certaines trajectoires. Nos données ne nous permettent pas pour l'instant de déterminer plus précisément ces tailles ainsi que les temps de résidence dans chaque microdomaine. L'équipe de Jacobson a proposé d'utiliser la probabilité qu'une particule brownienne reste confinée dans un domaine pendant un temps donné pour déterminer si la trajectoire observée est bien liée à un confinement plutôt qu'à un mouvement purement brownien. Cette méthode pourra être fort utile dans les expériences à venir.^[139;142]

Nous avons observé dans cette étude que le mouvement des toxines marquées et fixées à leur récepteur était confiné ce qui est une confirmation des résultats biochimiques obtenus par l'équipe de Miyata.^[125] Cette étude a démontré que l'activité de la toxine se déroulait dans des DRMs. En revanche, il n'est pas évident que le confinement que nous observons est dû uniquement à l'incorporation des récepteurs de toxine ε dans des radeaux lipidiques. Il pourrait tout aussi bien être provoqué par la présence du cytosquelette d'actine. De plus, contrairement à ce qu'affirmait cette équipe, il semble probable que toute l'activité de cette toxine ne se déroule pas dans un DRM unique dans la mesure où sur plusieurs trajectoires nous observons un saut d'un microdomaine à un autre.

Oligomérisation

Nous avons obtenu quelques séquences d'images montrant une possible oligomérisation entre toxines ε . Nous montrons dans la suite l'exemple du suivi de trois toxines marquées présentant une coalescence des taches d'émission associées (spot) ainsi qu'une nette diminution

du coefficient de diffusion des toxines au cours de l'enregistrement.

Cette expérience a été réalisée en ajoutant simplement une solution de toxines marquées sur des cellules MDCK maintenues à température ambiante, *i. e.* sans passer par l'étape à 4°C. La figure suivante montre 6 images prises à différents instants et extraites d'une séquence d'images de 6 min. L'image A correspond à une région de la membrane d'une cellule MDCK présentant une toxine marquée (T1) et prise 5 min après l'injection de toxines dans la solution de HBSS dans laquelle se trouvent les cellules accrochées à la lamelle. Cette toxine est animée d'un mouvement confiné. Ensuite, une autre toxine (T2), initialement en solution, se fixe à la membrane (image B) et présente elle aussi un mouvement confiné. Les deux toxines se meuvent *a priori* dans des microdomaines distincts (distance initiale entre les deux toxines $\approx 2\mu\text{m}$). Sur la séquence d'images, on observe clairement que sur certaines images les spots associés à ces deux toxines fusionnent pour ne former plus qu'une tache unique. Ceci indique que les toxines sont à une distance maximale d'environ 300 nm et certainement dans le même microdomaine puisque la taille des microdomaines a été évaluée à environ 800 nm. A la fin d'une série d'éloignement-rapprochement (image C), les deux taches (T1-T2) finissent par ne plus se séparer (image D). Ensuite, une autre toxine (T3) initialement en solution s'accroche à la membrane (l'image E montre l'arrivée de la toxine dont le spot associé est initialement défocalisé) à une distance d'environ 3-4 pixels ($\approx 1\mu\text{m}$) des deux premières toxines. Là encore, on observe un mouvement confiné des deux taches et une série d'éloignement-rapprochement qui aboutit enfin à une seule tache de diffraction (image E).

Afin de représenter plus clairement ces phases d'éloignement-rapprochement, nous avons choisi d'étudier la PL d'une des taches de diffraction. Nous avons ajusté les deux taches de diffraction associées à T1 et T2 puis T1-T2 et T3 par une fonction bidimensionnelle gaussienne. Quand les deux toxines marquées sont trop proches, l'ajustement ne se fait plus correctement (incertitude sur les paramètres d'ajustement forte). Le programme d'ajustement bascule alors vers l'emploi d'une seule fonction bidimensionnelle gaussienne. Ainsi, à chaque fois que deux taches sont trop proches (≈ 1.8 pixels pic à pic), nous prenons en compte le nombre de photons émis par les deux (dans le cas T1 et T2) et trois (dans le cas T1-T2 et T3) toxines marquées ce qui induit une nette augmentation du signal de PL associé. Nous montrons dans la figure suivante l'évolution temporelle de la PL détectée pour T1 (gauche) puis T1-T2 (droite).

Cette méthode rudimentaire permet de faire le lien entre distance entre taches de diffraction et nombre de photons émis par une des deux taches. Cependant, le photoblanchiment,

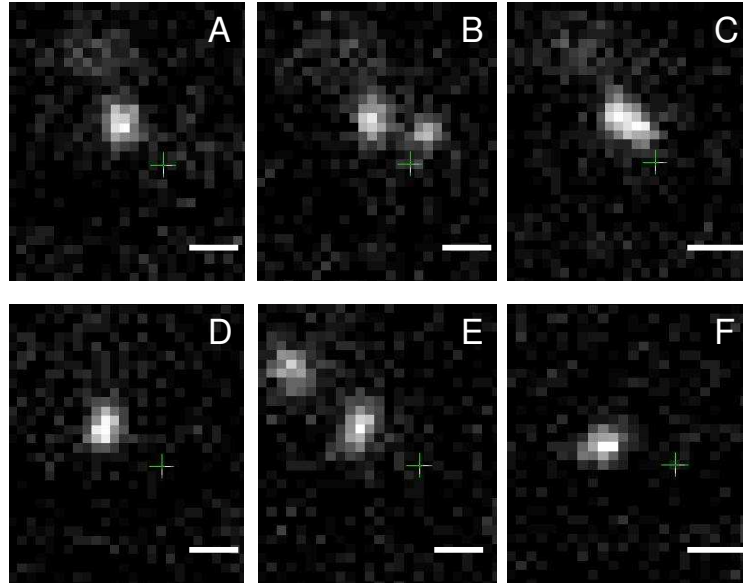


FIG. 7.8 – Dynamique de trois toxines marquées arrivant successivement dans une même région de la membrane des cellules MDCK. Formation possible d'un trimère de toxines marquées. A a été prise sur la séquence d'images 30 s après le début de l'acquisition, B après 34 s, C après 37 s, D après 69 s, E après 138 s et F après 158 s. $I_{inc}=7 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp}=50 \text{ ms}$, $T_{lecture}=70 \text{ ms}$, $T=21^\circ\text{C}$.

notamment, rend difficile une interprétation plus poussée des courbes de la Fig. 7.9 (cf. de 145 à 160s). Elle permet cependant d'observer qu'avant de se rapprocher définitivement (image D) les deux taches se rencontrent souvent. Ces différents résultats constituent une première indication d'une oligomérisation entre les trois toxines.

Pour confirmer ce point, nous nous intéressons à l'évolution du coefficient de diffusion des toxines. L'équipe de Kusumi a en effet proposé que du fait de la présence des "haies" et "piquets", la formation d'un oligomère induisait une diminution du coefficient de diffusion de la molécule oligomérique par rapport à sa forme monomérique.^[130] Par la méthode de la pente initiale des courbes de MSD, nous avons ainsi déterminé le coefficient de diffusion D sur trois tranches de temps (0-27 s, 77-102 s, 336-384 s) correspondant à la toxine T1 seule, au couple formé par T1 et T2 et au trio formé par T1, T2 et T3. On observe une baisse significative du coefficient de diffusion valant initialement $0.010 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, puis $0.0055 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ et enfin $0.003 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (incertitude sur la mesure négligeable). Notons que cette expérience a été conduite à température ambiante ce qui peut induire une diminution du coefficient de diffusion initiale (à 37°C $D=0.091 \pm 0.047$).

Pour l'instant, nos données ne sont pas assez nombreuses pour confirmer cet effet sur le coefficient de diffusion. Cependant cette approche semble intéressante et permet d'une

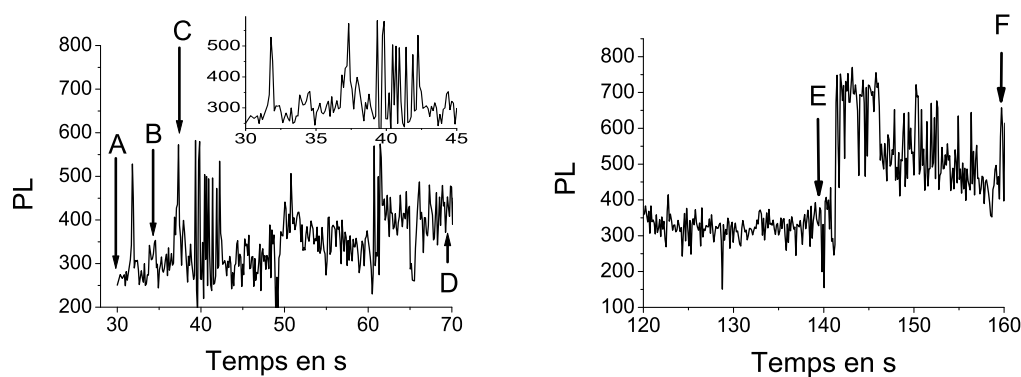


FIG. 7.9 – PL de la toxine marquée T1 (gauche) et de T1-T2 (droite). Chaque pic indique que la toxine marquée T2 (T3) se situe à moins de 570 nm de la toxine T1 (resp. T1-T2). $I_{inc}=3-5 \text{ kW.cm}^{-2}$, $T_{exp}=50 \text{ ms}$, $T_{lecture}=70 \text{ ms}$, $\text{Temp}=21^\circ\text{C}$.

certain manière de dépasser la limite par diffraction pour deux toxines marquées proches. Si ces résultats se confirment, nous pourrions estimer que les premiers mouvements de la toxine fixée à son récepteur peuvent passer par plusieurs microdomaines distincts et que dès lors que l'oligomérisation débute les sauts entre microdomaines deviennent de moins en moins probables.

7.3 Conclusions

Cette étude a tout d'abord démontré que nous pouvions suivre une biomolécule avec une résolution spatiale ($\approx 55 \text{ nm}$) et temporelle (50 ms de temps d'acquisition, 70 ms de temps de lecture) suffisante pour pouvoir quantifier le coefficient de diffusion et la nature du mouvement de la biomolécule. Ces deux types de résolution pourront être améliorés par l'utilisation de NPs recuites dont le rendement quantique est plus important, de lamelles en silice dont la fluorescence est plus faible que celle en verre et d'une caméra CCD à amplification d'électrons qui permet de réduire notamment le temps de lecture. La durée d'observation dans notre cas a été limitée essentiellement par des dérives thermiques de la platine du microscope mais il est clair que des durées d'observation d'au moins 10 min peuvent être réalisées grâce à ce type de NPs. Le nombre de toxines par NP doit être cependant réduit ce qui ne devrait pas poser de difficulté majeure.

Le confinement du mouvement de la toxine ε fixée à son récepteur a été démontré et les différentes caractéristiques du mouvement estimées ($D=0.091 \pm 0.047 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, $L=799\pm 311$

nm). Ce résultat est en accord avec l'observation par d'autres groupes d'une compartimentalisation dans des radeaux lipidiques de l'activité de la toxine ε . Un important travail reste cependant à fournir pour comprendre si l'origine du confinement est entièrement liée à ces radeaux lipidiques.

Enfin, le processus d'oligomérisation a été abordé. L'observation quantitative de ce processus sera certainement la partie la plus difficile du travail de recherche qu'il reste à faire tant au niveau expérimental pour se placer dans des conditions pour lesquelles sa survenue est observable qu'au niveau du traitement d'images.

Chapitre 8

Conclusions

Le travail de recherche présenté dans cette thèse s'est intéressé aux propriétés photophysiques et aux applications dans le domaine de la biologie cellulaire des nanoparticules (NPs) de vanadate d'Yttrium dopées par des ions Europium.

Nous avons démontré tout d'abord que nous pouvions mesurer précisément la taille de NPs individuelles en se basant sur un calcul simple du nombre de photons émis par NP et en accordant une attention toute particulière aux diverses sources d'extinction de la luminescence et au programme de traitement d'images. La précision finale de la mesure est tout à fait satisfaisante compte tenu du rapport signal sur bruit pour ces NPs. Cette méthode est simple d'application et automatisée. De plus, elle permet de s'assurer que, *in situ*, nous observons bien des NPs uniques. Cette méthode ouvre de plus des perspectives nouvelles. Au delà de son utilisation pour d'autres types de NPs à plusieurs centres émetteurs, on pourra par exemple, voir l'influence réelle de la taille des NPs sur la dynamique de protéines membranaires ou intracellulaires ou encore séparer, par le nombre de photons émis, des NPs de tailles différentes et marquant des biomolécules différentes.

Nous avons montré par la suite que le photoblanchiment des NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}$ est un mécanisme photo-induit présentant des constantes de temps caractéristiques s'étendant sur plusieurs ordres de grandeur. Ce photoblanchiment est entièrement lié à un mécanisme de photo-réduction des ions Europium trivalents initialement présents dans la structure cristalline. La photo-réduction s'explique probablement par le transfert d'un électron d'un défaut cristallin vers l'ion Europium. La dynamique de photo-réduction peut être séparée en deux étapes : une dynamique initiale et rapide liée à la photo-réduction des ions Europium du coeur

de la NP et une dynamique plus lente liée aux ions Europium proches de la surface. Nous avons ensuite proposé un modèle permettant de rendre compte de la dynamique de PR. Ce modèle est basé essentiellement sur la prise en compte de deux sous-régions à l'intérieur de la NP présentant des temps de vie du niveau excité de l'ion Europium différents et d'un type de transfert d'électrons entre défauts et ions Europium guidé uniquement par le nombre de ces deux espèces. Ce modèle est en bon accord avec les résultats expérimentaux. Toutefois, des expériences complémentaires devront être réalisées pour clarifier certains points importants. Tout d'abord, il faudra déterminer quelle est la nature des défauts cristallins et si ils sont bien la source d'électrons servant à réduire les ions Europium. Ensuite, le mécanisme par lequel l'électron est transféré du défaut vers l'ion Europium trivalent reste encore obscur. Il serait en particulier important de savoir si le défaut absorbe aux longueurs d'onde utilisées. De manière symétrique, il serait intéressant de savoir si l'ion Europium divalent absorbe à ces longueurs d'onde ce qui permettrait de préciser un peu plus comment l'électron peut repartir vers le défaut.

Par la suite, nous avons réalisé des expériences de transfert d'énergie résonant (FRET) entre ces NPs et un fluorophore organique. La mesure de ce transfert permet notamment d'inférer la distance entre deux biomolécules marquées par des sondes fluorescentes. Le FRET a été largement utilisé en biologie cellulaire pour détecter des processus d'association et de dissociation de biomolécules ou encore des changements de conformation de protéines. Le temps de vie long, le décalage de Stokes important et l'émission étroite de ces NPs ont rendu la détermination de ce transfert particulièrement facile. De plus, pour expliquer la différence obtenue entre différents types de mesures de l'efficacité de transfert, un modèle basé sur des donneurs multiples (ions Europium dans la NP) et des accepteurs multiples (fluorophores organiques complexés en surface des NPs) a été appliqué avec succès aux données expérimentales.

Concernant la fonctionnalisation des NPs, étape nécessaire avant toute utilisation de ces NPs en tant que sondes fluorescentes en biologie, nous avons utilisé le travail réalisé au LPMC portant sur l'encapsulation des NPs par une couche fine d'organosilane fonctionnalisé afin de coupler ces NPs à des protéines. Cette couche d'organosilane comporte des fonctions amines qui ont été utilisées lors du couplage. Un couplage à l'aide d'un cross-linker homobifonctionnel a ensuite été mis au point et comporte deux étapes. La première est constituée par la réaction du cross-linker avec les amines présentes à la surface des NPs dans du DMSO, un solvant

organique permettant de stabiliser les NPs. A l'issue de cette première étape, l'augmentation de la charge de surface des NPs permet de les stabiliser. Ensuite, la seconde étape permet le couplage entre NPs et protéines. Le processus de couplage avec les protéines a été évalué en termes de stabilité finale des NPs et de quantitativité du couplage des protéines. Enfin, une technique originale de détermination du nombre de protéines par NP individuelle et de la distribution de ce nombre a été proposée. Elle se base principalement sur un couplage préalable de la protéine à greffer aux NPs avec un fluorophore organique. Des mesures conjointes réalisées sur ce fluorophore organique à savoir le photoblanchiment par marches et le nombre de photons détectés initialement permettent alors de quantifier cette distribution à l'échelle de la NP unique. Enfin, en termes d'applications biologiques, nous pouvons envisager de mesurer les marches de photoblanchiment des fluorophores organiques puis de sélectionner uniquement les trajectoires ou d'autres caractéristiques des NPs couplées à un nombre déterminé de protéines.

Nous avons également proposé une nouvelle méthode de détection de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'aide de NPs uniques. Le peroxyde d'hydrogène est une molécule pouvant être utilisée par les organismes vivants comme outil de défense, dans le déclenchement de l'apoptose ou comme molécule de signalisation notamment vasculaire. Dans ce contexte, disposer d'un senseur local à H_2O_2 quantitatif et dynamique représente un enjeu majeur pour la compréhension de ces mécanismes cellulaires. En utilisant la PR des ions Europium trivalents, les NPs ont été préparées dans un état sensible à la présence d'espèces oxydantes. Le recouvrement de photoluminescence associé dépend alors de la concentration en H_2O_2 dans une large gamme allant de quelques μM à quelques mM. Les principaux facteurs influençant ce recouvrement ont été déterminés et notamment l'effet de l'intensité incidente sur la dynamique de recouvrement. Comme première application, nous avons étudié la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) induite par l'endothéline-1, une hormone à effet vasoconstricteur : un comportement original et biphasique a été observé lors de cette production. Ces résultats prometteurs doivent être associés à des mesures complémentaires portant sur la réactivité de ce type de senseur vis à vis d'autres oxydants et sur l'origine de ce comportement biphasique. Nous pensons enfin que de coupler le ciblage d'enzymes impliqués dans la production de ROS par le biais de fonctionnalisations de NP adaptées et la détection locale de ROS pourrait être une application importante de ce type de senseur.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la dynamique membranaire de la toxine ϵ marquée

à l'aide de nos NPs. Cette étude a tout d'abord démontré que nous pouvions suivre une biomolécule avec une résolution spatiale (≈ 55 nm) et temporelle (50 ms de temps d'acquisition) suffisante pour pouvoir quantifier le coefficient de diffusion et la nature du mouvement de la biomolécule. Le confinement du mouvement de la toxine ε ancrée à son récepteur a été démontré et les différentes caractéristiques du mouvement estimées. Ce résultat est en accord avec l'observation par d'autres groupes d'une compartimentalisation dans des radeaux lipidiques de l'activité de la toxine ε . Un important travail reste cependant à fournir pour comprendre si l'origine du confinement est entièrement liée à ces radeaux lipidiques. Enfin, le processus d'oligomérisation de cette toxine a été abordé. L'observation quantitative de ce processus sera certainement la partie la plus difficile du travail qu'il reste à faire sur cette problématique.

En dehors d'un vaste choix d'applications biologiques, beaucoup de progrès sont possibles au niveau de l'amélioration des propriétés optiques, de la dispersion en taille, de la détection, par exemple retardée, et de la mise au point d'autres NPs basées sur des matrices et des ions émetteurs différents. Ainsi, les NPs d'oxyde dopées par des ions lanthanides peuvent être considérées comme des NPs très prometteuse aussi bien pour le suivi de biomolécules individuelles que pour la détection d'espèces oxydantes.

Annexe A

Détermination robuste du nombre de photons émis par NP

Nous présentons dans cette annexe le traitement d'images qui nous a permis de déterminer de manière automatique et précise le nombre de photons émis par NP.

Dans la mesure où nous souhaitons obtenir une statistique importante de NPs et disposer d'une méthode rapide et reproductible, le recours à une procédure de traitement d'images robuste s'impose. De plus, ce traitement doit pouvoir convenir à une large variété de signal de fond. A ce propos, nous définissons le signal de fond comme toutes les sources de photons qui ne proviennent pas des NPs. Essentiellement, ce signal de fond a pour origine la fluorescence de la lamelle de verre. Nous appelons de plus "spot", la tache de diffraction associée putativement à une NP unique. Pour les conditions mentionnées précédemment, le signal de fond est proche de 400 coups. Dans la mesure où la distribution du nombre de coups détectés par NPs est large (typiquement de 50 à 2000 coups), nous devons traiter des signaux qui peuvent être relativement faibles. Il faut en plus que l'on soit capable dans ces cas de faibles signaux de déterminer précisément quelle erreur nous commettons dans leur mesure et d'éviter toute erreur systématique liée à l'amplitude des signaux.

Une méthode de choix s'impose : elle consiste à créer une image théorique. Cette image reproduisant fidèlement les images expérimentales, *i. e.* les signaux de chaque spot lumineux avec le signal de fond, doit nous permettre d'optimiser notre programme de traitement d'images afin que le nombre de photons mesuré soit bien celui auquel nous nous attendons. Nous ne présenterons cependant pas, dans la suite, ce travail d'optimisation, nous nous bor-

nerons à expliquer les différentes étapes de la version finale de ce traitement à l'aide de ces images théoriques. Au cours de cette description, nous détaillerons aussi quelques opérations de base de traitement d'images. Nous pourrions de plus clairement quantifier des paramètres aussi importants que le nombre de spots correctement identifiés en fonction de l'amplitude du signal associé à chaque spot. Nous pourrions donc savoir en fonction d'un signal de fond déterminé quel est par exemple le seuil de détection de notre traitement et indirectement, comme nous le verrons dans la prochaine section, le seuil de détection en termes de taille de NP.

A.1 Création d'une image théorique

La constitution de cette image nécessite trois étapes. La première est de reproduire le signal de fond qui peut être approximé par une gaussienne bidimensionnelle. La seconde est de positionner les NPs dans l'image avec un nombre de NPs, un nombre de photons associés et une position parfaitement déterminés. Enfin, il ne reste plus qu'à additionner pixel par pixel ces deux parties et à rajouter sur chaque pixel une fluctuation du nombre de photons suivant une distribution poissonnienne. En effet, dans nos conditions expérimentales les autres sources de bruit (électroniques, thermiques..) sont négligeables devant le bruit de photons.

En premier lieu, on écrit le signal de fond $B(i, j)$ sur chaque pixel défini par le couple (i, j) sous la forme :

$$B(i, j) = A_0 + A_b e^{-\frac{2(i - i_0)^2}{\sigma_b^2} - \frac{2(j - j_0)^2}{\sigma_b^2}}. \quad (\text{A.1})$$

, où A_0 représente les sources de lumière parasite et i_0 et j_0 la position du pixel central. Les différents paramètres sont déterminés en utilisant une lamelle de verre sans NPs. Typiquement, des acquisitions d'images de 200X200 pixels sont réalisées avec une amplitude du signal de fond de 300 coups et un σ_b de 280 pixels. Nous utilisons un objectif 100X et un système de lentilles afocal, placé avant la CCD, d'un grandissement de $\frac{8}{5}$ ce qui conduit à une valeur de 120 nm au niveau de la lamelle pour chaque pixel de l'image.

Comme le signal de fond vient, dans notre cas, essentiellement de la fluorescence de la lamelle, le profil mesuré pour le signal de fond correspond au profil d'intensité du laser au niveau de la lamelle. En plaçant un calorimètre au dessus de la lamelle, on peut avoir accès à la puissance laser incidente. Cette puissance correspondant à l'intégrale de l'intensité, ceci

permet de mesurer en chaque point l'intensité incidente sur les NPs . Du point de vue pratique, nous faisons une marque sur la lamelle afin de trouver la bonne hauteur de focalisation. En effet, une erreur sur la hauteur de focalisation entraîne une erreur sur l'estimation de la largeur à mi-hauteur de la gaussienne, cette erreur se répercutant alors directement sur l'estimation de l'intensité incidente.

Il s'agit à présent de créer la PSF (Point Spread Function) théorique, *i. e.* une fonction décrivant l'image d'un point source, ici une NP, à travers le système optique de détection. Les données obtenues sur les NPs les plus lumineuses permettent de quantifier la forme de cette PSF. Nous nous limitons dans la suite à la forme de cette PSF dans le plan de la lamelle. Elle peut être là encore correctement représentée par une gaussienne 2D symétrique :

$$S(i, j) = A_s e^{-\frac{2(i - i_0)^2}{\sigma_s^2} - \frac{2(j - j_0)^2}{\sigma_s^2}}. \quad (\text{A.2})$$

La largeur à mi-hauteur σ_s est un paramètre tout à fait essentiel en termes de détection car il conditionne l'étalement des photons émis par une NP sur un plus ou moins grand nombre de pixels et donc le nombre de photons reçus par pixel. Là encore, se placer à la bonne hauteur de focalisation en minimisant la largeur à mi-hauteur de S est primordial. Il convient alors de mesurer précisément la valeur de cette largeur à mi-hauteur et aussi de s'assurer que d'une image à l'autre le plan de focalisation est correctement trouvé de façon visuelle.

Nous procédons de la façon suivante : des NPs sont déposées sur une lamelle en verre afin d'enregistrer, après optimisation visuelle, 13 images, correspondant à des endroits différents de la lamelle. Pour chacune de ces images, nous estimons la largeur (FWHM) à l'aide du programme de traitement d'images que nous présenterons par la suite. Sur le graphique de gauche de la figure 8, nous reportons pour chaque image la moyenne de la largeur à mi-hauteur mesurée sur un vingtaine de NP à l'aide d'un ajustement 2D gaussien. Nous voyons clairement que chaque image présente la même moyenne aux erreurs sur la mesure près. Ainsi, nous pouvons être sûrs qu'une estimation visuelle de la bonne hauteur de focalisation est suffisante. Nous pouvons de plus vérifier a posteriori que la moyenne des largeurs obtenue sur une image quelconque correspond bien à cette valeur qui peut donc servir comme référence étant entendu qu'elle est spécifique au système optique considéré (objectif, valeur de grandissement de l'éventuelle afocale présente avant la CCD...). Il est bon de rappeler que les fluctuations sur cette largeur ne sont pas liées à des fluctuations réelles de largeur de PSF : elles sont

en fait liées aux effets de pixellisation et à la distribution poissonnienne du nombre limité de photons reçu par pixel.

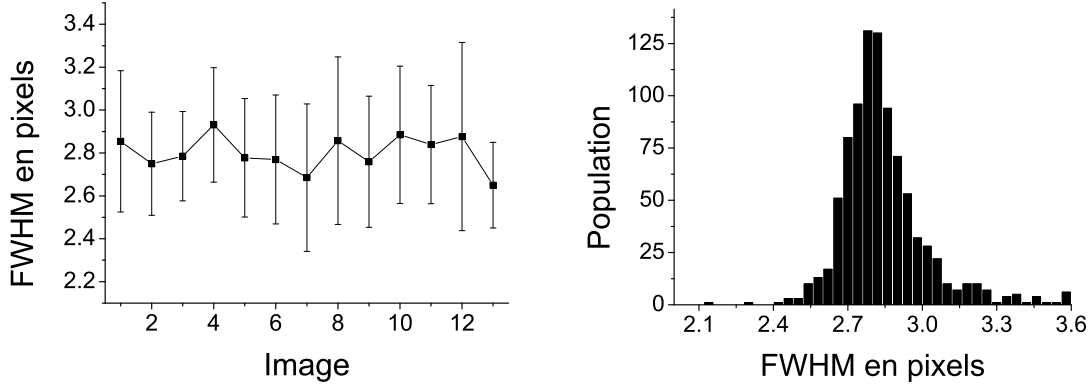


FIG. A.1 – Moyenne des largeurs à mi-hauteur mesurées sur un ensemble de NPs individuelles pour différentes positions sur la lamelle (gauche) et histogramme des largeurs à mi-hauteur déduit de l'ensemble des images (droite).

L'histogramme de droite montre simplement que la moyenne de cette largeur peut être dans ce cas bien définie et se situe autour de 2.8 pixels, valeur que nous conserverons pour créer l'image théorique.

Pour l'étape consacrée à l'introduction du signal des NPs dans l'image théorique, il ne nous reste plus qu'à positionner les NPs. Au choix, nous pouvons les répartir soit aléatoirement soit sur un réseau de pas prédéfini. Notons toutefois que pour chaque position dans l'image correspond une intensité incidente et que nous devons en tenir compte dans le nombre de photons émis par NPs même si cette variation d'intensité dans la zone considérée est relativement faible (200x200 pixels à comparer à la FWHM du faisceau au niveau de la lamelle de 280 pixels).

Enfin, il suffit d'additionner ces deux images (signal des NPs et signal de fond) puis pour chaque pixel de tenir compte de la distribution poissonnienne du nombre de photons émis inhérente à tout processus d'émission. La Fig. A.2 montre le résultat de cette approche pour deux types de NPs émettant en moyenne 800 et 2000 photons. La gamme des couleurs s'étend sur l'ensemble des valeurs du nombre de photons.

Dans la suite, nous présenterons comment fonctionne le programme de traitement d'images permettant d'associer à chaque spot un nombre de photons. Son fonctionnement sera présenté à l'aide de ce type d'images théoriques.

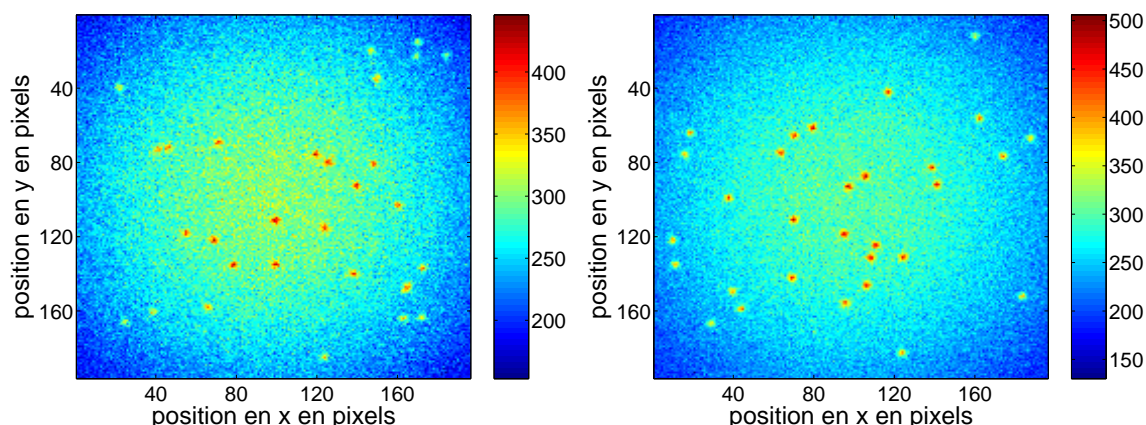


FIG. A.2 – Exemples d'images théoriques obtenues pour un nombre moyen de photons par NPs de 800 (gauche) et 2000 (droite). Le nombre de NPs est fixé à 30 par image avec un signal de fond d'amplitude 300 et de largeur à mi-hauteur de 280 pixels.

A.2 Présentation du programme de traitement d'images

Classiquement, une approche pour ce type de traitement est de raisonner sur le signal des objets que l'on cherche à quantifier. Or nous avons vu précédemment que ces signaux pouvaient être relativement faibles comparés au signal de fond et que de plus ce signal de fond n'était pas constant sur l'ensemble de l'image. Afin de traiter automatiquement un grand nombre d'images, la première des difficultés est de créer un masque binaire permettant de séparer spatialement les zones contenant les NPs de celles n'en contenant pas (signal de fond). Nous proposons alors un point de vue radicalement opposé : nous allons raisonner uniquement sur le signal de fond pour créer ce masque, *i. e.* le cheminement sera d'estimer la forme et l'amplitude de ce signal puis de fixer un seuil dépendant directement des fluctuations de ce signal. Une fois ce masque créé, le signal de fond à l'emplacement des NPs sera interpolé. Enfin, il ne restera plus qu'à attribuer un nombre de photons à chacune des zones représentant des NPs individuelles et à estimer précisément la position de ces NPs.

A.2.1 Rappel sur le filtrage spatial

Il est utile pour la suite de faire un bref rappel de la technique de filtrage en traitement d'images. Nous présentons l'effet d'un filtre moyennneur sur une image en niveaux de gris.

Le filtrage spatial consiste à convoluer pour chaque pixel (i,j) l'image $I(i,j)$ avec un filtre

$F(i,j)$, le résultat $R(i,j)$ s'écrivant comme :

$$R(i,j) = \sum_{W_k} \sum_{W_l} F(k,l)I(i-k, j-l) \quad \text{avec} \quad F = \begin{matrix} \begin{matrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{matrix} \end{matrix} \quad (\text{A.3})$$

où la sommation s'effectue sur le voisinage de chaque pixel W_k et W_l . Concrètement, pour un filtre moyennneur F de dimension 3, le filtrage consiste à balayer avec ce filtre tous les pixels de l'image et à prendre pour chaque position la moyenne des valeurs des pixels environnants. Ci-dessous est présenté l'effet d'un tel filtre sur une image en niveaux de gris en indiquant sur la matrice du milieu de la Fig. A.3, une des positions occupée par le filtre (en rouge).

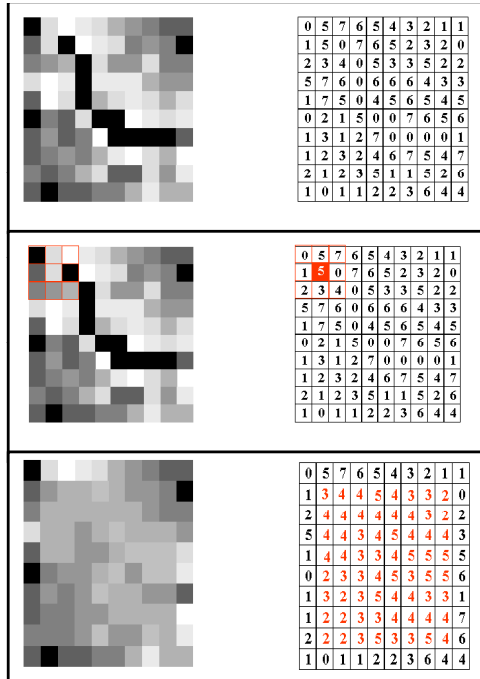


FIG. A.3 – Effet d'un filtre moyennneur 3 par 3 sur une image en niveaux de gris. En haut, image et matrice correspondante initiales, au milieu exemple de positionnement du filtre moyennneur matérialisé par un carré rouge, en bas résultat du moyennage.

De nombreux filtres existent du type gradient, laplacien, passe-haut, passe-bas..., mais aussi des combinaisons de filtre, par exemple l'ouverture qui sera présentée par la suite et qui permet de purifier des images. Enfin, l'effet du filtre est généralement normalisé en divisant l'image finale par la somme des normes des valeurs du filtre.

A.2.2 Création du masque binaire

Tout d'abord, nous estimons le signal de fond. Le filtre laplacien est particulièrement adapté dans ce cadre car son application permet d'une part de rehausser toutes les variations brusques d'intensité dans l'image, ces variations correspondant au passage d'une zone de signal de fond à une zone de signal d'une NP, et d'autre part d'éliminer complètement la valeur moyenne du signal de fond afin de ne laisser dans ces zones que la moitié des fluctuations du signal de fond comme expliqué dans ce qui suit.

Voyons comment ce filtre agit. Nous choisissons le filtre laplacien 5 par 5 suivant. Dans une

| | | | | |
|----|----|----|----|----|
| -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| -1 | -1 | 24 | -1 | -1 |
| -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |

zone sans NPs, si nous écrivons que le signal est caractérisé par une valeur moyenne m et une déviation standard σ , nous pouvons écrire que la valeur d'intensité I en un pixel donné vaut $m+c$ avec $c \in [-3\sigma, 3\sigma]$. Ainsi, après application du filtre en un pixel, l'intensité I_f s'écrit :

$$I_f = \frac{1}{48}(24xI_{central} - 1 \sum I_{environnant}) \quad (\text{A.4})$$

$$= \frac{m+c}{2} - \frac{m}{2} \quad (\text{A.5})$$

$$= \frac{c}{2}. \quad (\text{A.6})$$

On comprend alors tout l'intérêt de ce filtre qui permet d'éliminer complètement les variations de valeur moyenne dans l'image.

Ensuite nous homogénéisons l'image à l'aide d'un filtre moyennneur trois par trois. Les deux histogrammes de la Fig. A.4 représentent les distributions du nombre de photons obtenues sur une image théorique sans NPs, présentant un signal de fond constant de 300 photons et après application du ou des filtre(s) laplacien et moyennneur.

Ces distributions sont évidemment parfaitement gaussiennes et centrées sur 0. Elles sont caractérisées par un écart-type de 8.9 photons qui correspond bien au $\frac{\sqrt{300}}{2}$ dans le cas du filtre laplacien seul et de 2.2 photons après application supplémentaire du filtre moyennneur, *i. e.* une division par quatre de l'écart-type. Ceci est tout à fait intéressant dans la mesure où nous pouvons à présent définir de façon rigoureuse un seuil qui ne dépendra que de la

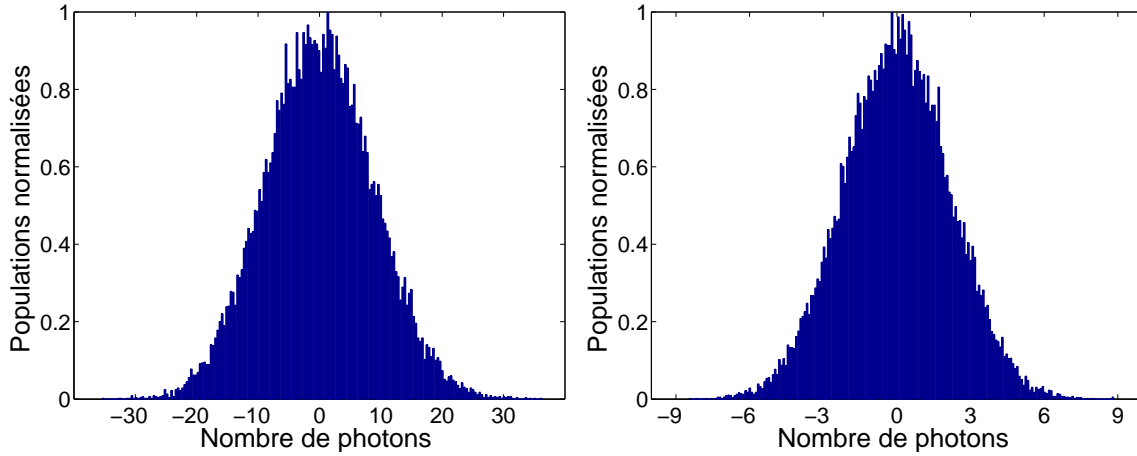


FIG. A.4 – Distribution du nombre de photons sur une image théorique avec un signal de fond d’amplitude constante de 300 photons après application du filtre laplacien (gauche) et du filtre laplacien suivi du filtre moyeneur (droite).

valeur du signal de fond (de forme gaussienne $B(i, j)$). Ainsi, nous pouvons écrire que ce seuil $Seuil(i, j)$ déterminé par un nombre d’écart-type, n_σ , restant à définir :

$$Seuil(i, j) = \sqrt{B(i, j)} \frac{n_\sigma}{8}. \quad (\text{A.7})$$

Ainsi, si nous choisissons de prendre ce nombre d’écart-types égal à 1, le seuil sera supérieur à 84% des valeurs du signal de fond (50% pour toutes les valeurs négatives et 34% pour les valeurs positives $\leq \sigma$). Nous serons donc sûrs que l’essentiel des zones sans NPs sera rejeté.

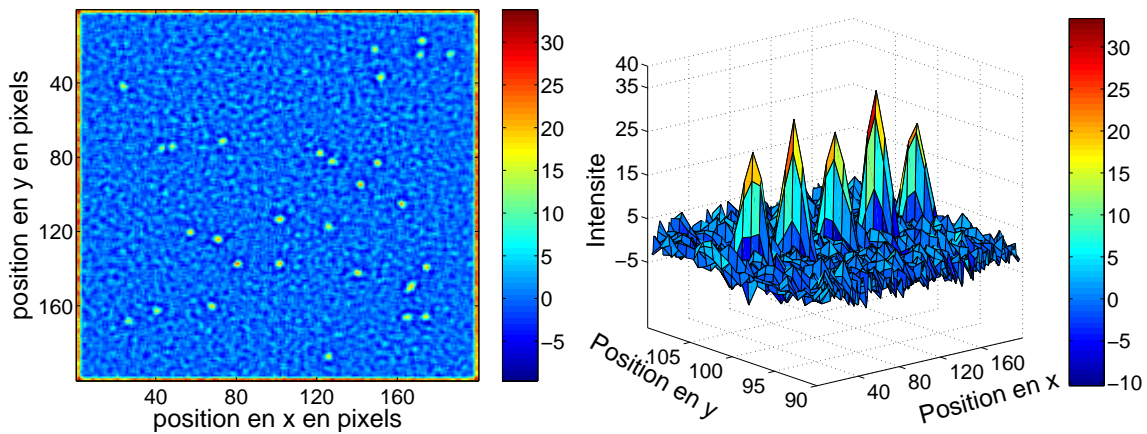


FIG. A.5 – Effet d’un filtre laplacien sur une image théorique contenant des NPs emettant 800 photons (gauche). Vue en 3D d’une autre image théorique présentant 5 NPs alignées émettant 2000 photons (droite).

Sur les deux images de la Fig. A.5, nous voyons clairement l’effet du filtre laplacien :

les NPs apparaissent plus clairement sur l'image et les zones sans NPs dans toute l'image possèdent à présent une valeur moyenne nulle.

Il est important de bien préciser que même si généralement on utilise la PSF, qui peut être considérée comme un filtre, afin de rehausser le signal des NPs, ici son utilisation est inutile dans la mesure où elle ne permet pas d'enlever le signal de fond. Nous montrons dans la Fig. A.6 l'effet d'une convolution de l'image de départ avec la PSF. Indéniablement, l'utilisation du laplacien est plus adaptée.

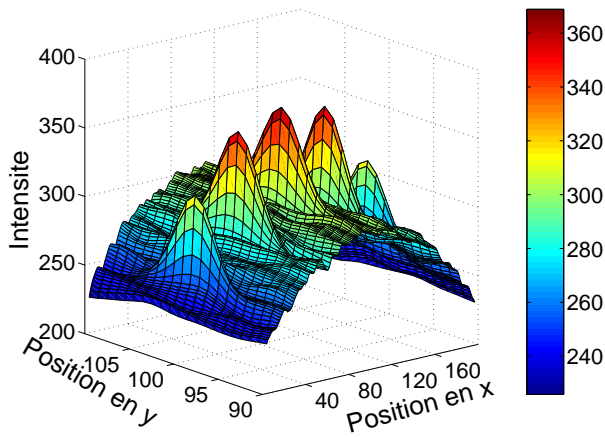


FIG. A.6 – Effet d'un filtre basé sur la PSF sur l'image théorique présentant 5 NPs alignées émettant 2000 photons chacune.

Il s'agit à présent de créer un masque permettant de distinguer les zones correspondant à des NPs de celles du signal de fond. Une première technique pourrait consister à seuiller l'image afin de retirer les zones de NPs puis d'estimer les fluctuations de l'image. En réalisant cette opération sur toute l'image, on ne prendrait pas en compte le fait que les fluctuations sont plus importantes au centre de l'image que sur les bords. Nous proposons alors de réaliser le masque en deux temps.

Un premier seuil basé sur la moyenne du nombre de photons sur toute l'image est d'abord créé. Le signal des NPs étant faible et occupant une zone totale restreinte, ce premier seuil permet de distinguer une grande partie des NPs. Nous créons alors un masque binaire inverse : les 0 correspondent aux zones NPs, les 1 au signal de fond. Ce masque est appliqué à l'image de départ : il en résulte une image où les régions de valeurs non-nulles correspondent aux zones sans NPs. Un ajustement gaussien 2D sur cette image est réalisé. Nous avons alors à disposition l'amplitude de ce signal de fond ce qui permet de remonter aux fluctuations locales observées après application des filtres laplacien et moyennneur. Nous utilisons alors le seuillage mentionné plus haut (avec $n_\sigma = 3$).

Nous en déduisons le masque non-inversé de la Fig. A.7 (gauche). Nous remarquons que le seuil a effectivement rempli son rôle : l'essentiel du signal de fond a disparu. Il persiste cependant des zones de 1-2 pixels qui ne correspondent pas à des NPs. Dans la mesure où l'image comporte 40000 pixels il est tout à fait normal que statistiquement certains pixels du signal de fond passent au dessus du seuil. Pour $n_\sigma = 3$, le seuil permet de rejeter 99.5% des pixels des zones sans NPs ce qui correspond à 200 pixels franchissant le seuil. En revanche la probabilité que deux pixels franchissent le seuil et soient côte à côte est considérablement plus basse. On observe d'ailleurs clairement cet effet sur la Fig. A.7.

L'application de deux filtres particuliers et successifs sur le masque est alors utilisée. Brièvement, cette opération dite d'ouverture consiste à éroder d'abord toutes les zones de NPs puis à reconstituer par une dilatation les zones qui n'ont pas disparu lors du premier filtrage. En plus de symétriser toutes les zones de NPs, elle permet de retirer du masque tous les pixels individuels de valeurs non-nulles. Nous pouvons voir cet effet sur l'image de droite de la Fig. A.7.

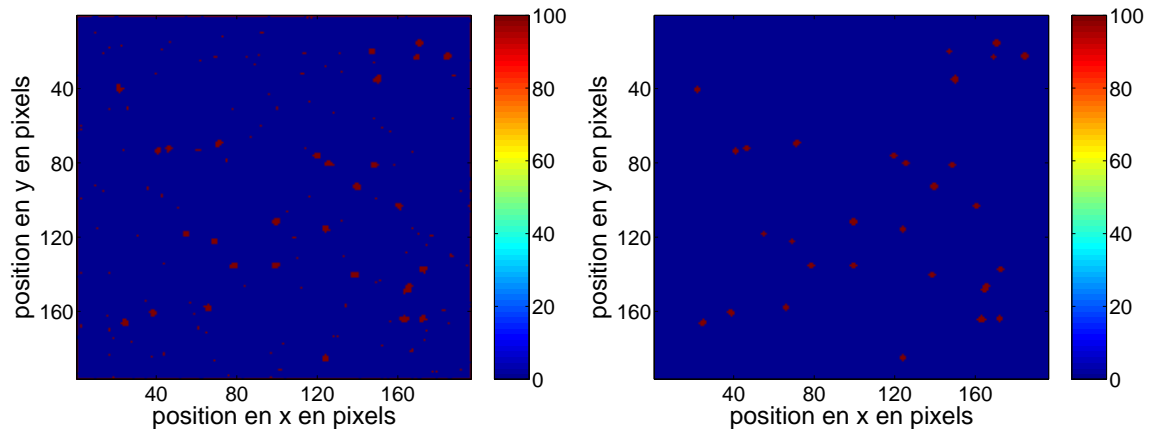


FIG. A.7 – Masque binaire non-purifié (gauche) : 0 pour les zones sans NPs, 100 pour celles avec NPs. Masque binaire purifié par application d'une "ouverture"(droite).

Enfin, le masque binaire définitif est déduit du précédent en ajoutant une étape de dilatation permettant de retrouver la surface initiale en pixels de chaque NP. Dans la Fig. A.8, nous représentons ce masque dilaté ainsi que l'image de départ. L'ensemble des NPs a été ainsi correctement retrouvé.

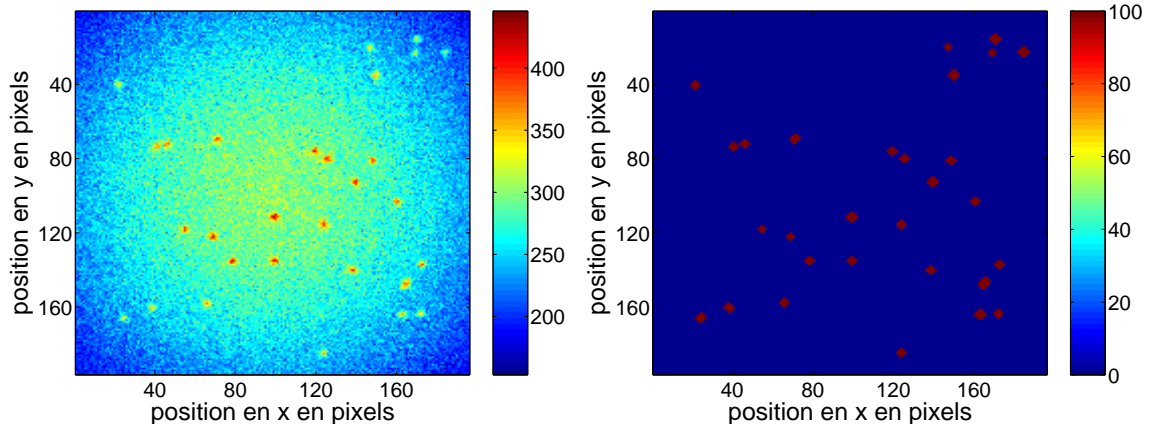


FIG. A.8 – Image théorique de départ (gauche) et masque final (droite) : en rouge zones de NPs et en bleu zones sans NPs.

A.2.3 Soustraction du signal de fond et image finale

A partir du masque binaire précédent, nous allons pouvoir interpoler le signal de fond à l'emplacement des NPs. Nous avons dans ce qui précède donné une première estimation du signal du fond. Nous allons l'estimer une seconde fois en tenant compte cette fois du masque plus précis qu'est le masque définitif.

Tout d'abord, le signal de fond est lissé. Dans ce but, le masque définitif est inversé, *i. e.* des 0 pour les NPs et des 100 pour le signal de fond. Le filtre moyenneur 3 par 3 est ensuite appliqué sur cette image. Puis, afin de ne pas moyenner les valeurs nulles correspondant aux NPs et les zones adjacentes de signal de fond, ce masque inversé est réappliqué (Fig. A.9 : en haut à gauche).

Ensuite, le signal de fond au niveau des zones de NPs est interpolé (Fig. A.9 : en haut à droite). Nous obtenons alors une image complète du bruit de fond à laquelle nous appliquons de nouveau un ajustement 2D gaussien. Cet ajustement est la meilleure mesure que nous puissions avoir du bruit de fond.

Ce bruit est soustrait à l'image de départ (Fig. A.9 : en bas à gauche). Enfin, le masque non dilaté est appliqué une dernière fois à cette image (Fig. A.9 : en bas à droite). Nous appliquons le masque non dilaté afin de ne pas avoir trop de zones de NPs qui se touchent et qui pourraient être considérées, sans attention particulière, comme une NP unique.

Il ne reste donc plus qu'à attribuer un nombre de photons et une position à chacune de ces zones. Sans rentrer dans les détails, cette étape consiste à associer à chaque zone de valeurs non-nulles et présentant un nombre de pixels compris entre 3 et 64 (afin de ne pas considérer

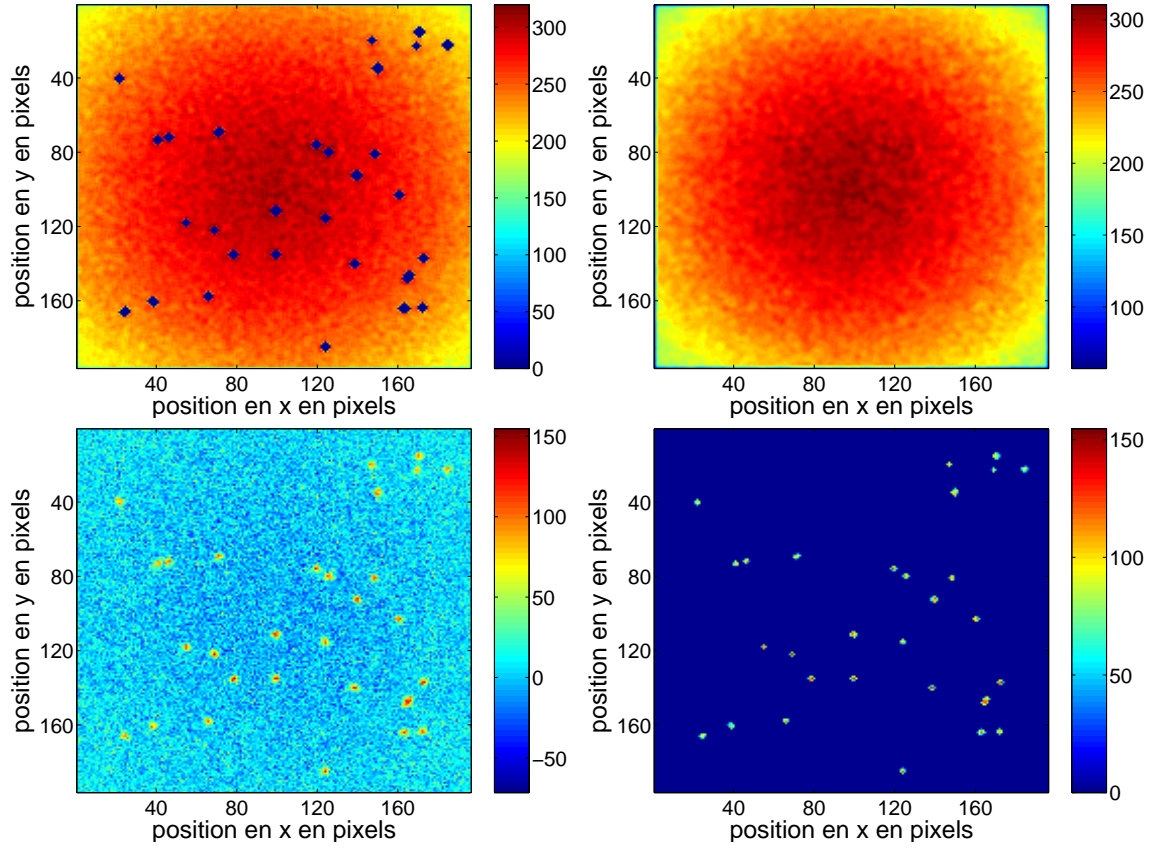


FIG. A.9 – En haut à gauche : signal de fond lissé. En haut à droite : interpolation du signal de fond. En bas à gauche : image de départ sans le signal de fond retiré après ajustement. En bas à droite : image finale avec des 0 pour les zones sans NPs et les valeurs réelles pour les NPs.

des spots qui se touchent), un carré de pixels où l'on réalisera un ajustement 2D gaussien nous permettant d'accéder au nombre de photons détecté pour chaque NP et à la position précise de ces NPs. Notons que nous ajoutons à cet ajustement 2D gaussien un offset permettant de prendre en compte des erreurs faibles et locales de l'ajustement du signal de fond et aussi les éventuelles inhomogénéités des images dues aux défauts des optiques avant et après la lamelle, dans le cas réel de l'expérience. Enfin, notons que nous avons parlé essentiellement dans ce qui précède de photons mais en fait le signal donné par la CCD s'exprime en "coups" avec une correspondance entre le nombre de coups et le nombre de photons dépendant du gain de la caméra. Comme précédemment, nous identifierons dans la suite coups et photons.

A.3 Efficacité du traitement d'images

A l'aide des images théoriques, nous allons à présent quantifier l'efficacité de ce traitement d'images. Nous le ferons pour deux amplitudes de signal de fond correspondant aux deux cas réels d'une lamelle en verre et d'une lamelle en quartz.

Les paramètres essentiels que nous voulons quantifier sont : le fraction du nombre de NPs détectées et l'erreur commise sur chaque détermination du nombre de photons émis et ce pour différents nombres totaux de photons émis par NP. Pour ce faire, nous utilisons une image théorique où 361 NPs sont positionnées sur un réseau. Les résultats sont similaires pour une répartition aléatoire des NPs. Nous voulons de plus quantifier l'effet du seul paramètre ajustable du programme à savoir le nombre d'écart-types intervenant dans la définition du seuil séparant les NPs du signal de fond (éq. A.7).

A.3.1 Cas d'un fort niveau de signal de fond

Nous rappelons que dans ce cas, nous prenons un signal de fond d'amplitude maximale égale à 300 photons et de largeur à mi-hauteur 280 pixels. Nous définissons l'efficacité de détection du programme de traitement d'images comme le nombre de NPs détectées correctement, *i. e.* localisées au bon emplacement, sur le nombre total de NPs. Si l'on choisit un nombre d'écart-types inférieur à 1.5, un nombre non-négligeable de NPs sont détectées qui ne correspondent en fait à aucune NP réelle. En revanche, pour les valeurs supérieures ou égales à 1.5, 100% des NPs détectées correspondent à des NPs réelles et ce quelque soit la luminosité des NPs considérées. Nous choisissons donc de montrer en premier lieu l'efficacité de détection en fonction du nombre total de photons émis par chaque NP. De plus, nous reportons cette efficacité pour chaque valeur du seuil (Fig. A.10 à gauche). Evidemment, plus ce seuil est élevé moins le programme va détecter des NPs faiblement lumineuses. Ces premières courbes sont à considérer conjointement avec les erreurs associées à chaque mesure du nombre de photons (Fig. A.10 à droite). En effet, pour les seuils faibles un grand nombre de NPs sont détectées mais l'estimation du nombre de photons se trouve entachée d'une erreur importante pour les NPs les moins lumineuses. Par exemple, pour un nombre total de photons égal à 300, l'erreur moyenne mesurée sur un ensemble de NPs individuelles est de -80% ce qui correspond à une surestimation du nombre de photons.

Il peut paraître étonnant que l'erreur moyenne ne soit pas nulle. Cette erreur correspond

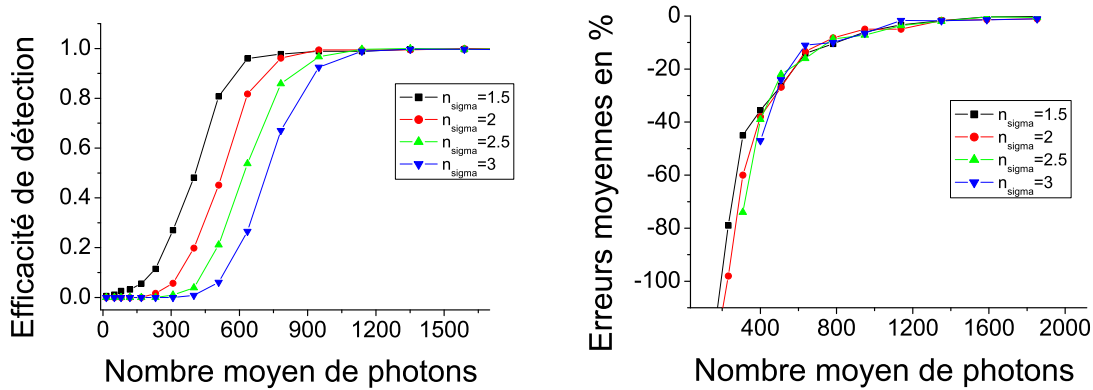


FIG. A.10 – Efficacité de détection du programme de traitement d'image et erreurs moyennes sur la détermination du nombre de photons en fonction du nombre moyen et théorique de photons. Chacune de ces deux figures est montrée pour différents nombres d'écart-types (n_{σ}) utilisés pour la détermination du seuil. Nous employons le terme de moyen pour le nombre de photons car l'intensité sur un image n'est pas constante ce qui entraîne une variation du nombre de photons émis pour les NPs.

au fait que statistiquement lors de l'ajustement gaussien, le programme a plus tendance à sur-estimer la largeur à mi-hauteur qu'à la sous-estimer. Ainsi, à amplitude maximale constante, le programme attribue un nombre de photons plus important. Nous pourrions alors borner les valeurs de cette largeur à mi-hauteur. Cependant, l'introduction de ces bornes induirait un effet de seuillage qui se relève être difficilement quantifiable. Nous préférons alors conserver cette erreur systématique mais borner son importance en choisissant un seuil plus haut typiquement entre 2.5 et 3 écart-types du signal de fond.

Remarquons de plus que les courbes pour différents seuils sont remarquablement similaires ce qui conduit à considérer que, même si pour les faibles signaux nous commettons une erreur, cette erreur est quantifiable et que nous pouvons a posteriori corriger statistiquement chaque mesure. Il est utile aussi de noter que pour un nombre total de 300 photons le rapport signal sur bruit est faible. Si nous définissons classiquement le signal d'une NP comme la valeur du pixel central et le bruit comme la racine carré du signal de la NP sommé à celui de fond ce rapport est égal à 1.2. Visuellement, cela correspond à une image où il est extrêmement difficile de distinguer les NPs. Insistons de plus sur le fait que sur une distribution entière du nombre de photons, ces erreurs ne concerneront qu'une partie minime de cette distribution dans la mesure où peu de NPs faiblement lumineuses sont détectées. Ainsi, la possibilité de réduire l'importance de ces erreurs et de pouvoir les quantifier semble tout à fait satisfaisante. Enfin, nous pouvons remarquer que pour un nombre total de photons détectés au dessus de

600 photons ce qui correspond à un rapport signal sur bruit de 2.6, l'erreur est inférieure à 10%.

Nous étudions à présent et plus en détail le cas d'un faible niveau de signal de fond.

A.3.2 Cas d'un faible niveau de signal de fond

Nous montrons ci-dessous comme précédemment l'efficacité de détection et l'erreur commise sur la mesure pour chaque nombre total de photons. Comme attendu, nous observons un décalage du seuil de détection vers les plus faibles nombres de photons. Nous confirmons qu'un nombre d'écart-type de 2.5 contraint l'erreur à rester inférieure à 40% quelque soit le nombre total de photons par NPs.

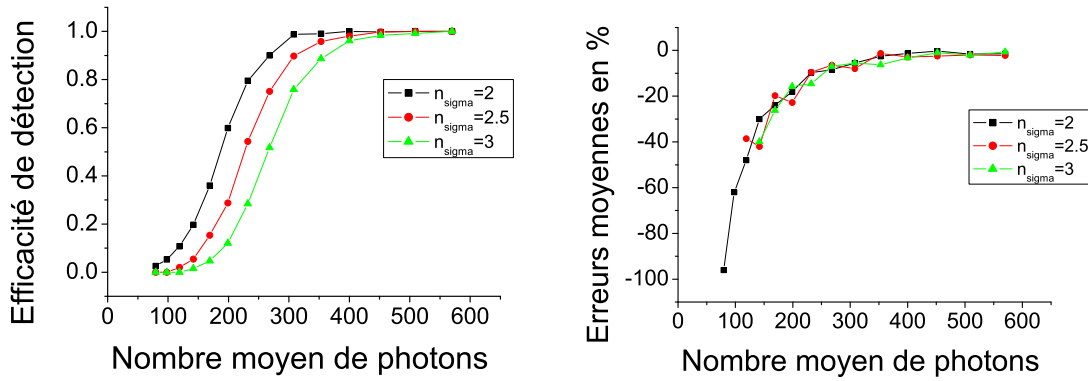


FIG. A.11 – Efficacité de détection du programme de traitement d'image et erreurs moyennes sur la détermination du nombre total moyen de photons en fonction du nombre moyen et de photons. Les résultats sont donnés pour différents nombres d'écart-type (n_{sigma}).

A.3.3 Cas d'une distribution de NPs de tailles différentes

Le cas réel de l'expérience correspond en fait à une distribution de NPs de luminosités différentes présentes sur chaque image. Il faut donc s'assurer à présent qu'il est équivalent de considérer l'efficacité de détection pour chaque luminosité puis de remonter à l'efficacité de détection sur l'ensemble de la distribution et celle obtenue directement sur la distribution complète.

Pour ce faire, nous créons une distribution homogène de nombre de photons répartie entre 50 et 500 photons. Nous ajoutons de plus sur chacun de ces nombres les variabilités liées à

la position des NPs et au bruit de photon. Nous traitons successivement plusieurs images ce qui conduit à plus de 1800 NPs détectées sur 3600 NPs virtuelles. Nous tenons compte de l'efficacité de détection calculée et la multiplions avec la distribution de NPs virtuelles de départ (Fig. A.12, $n_{sigma} = 2.5$). Ensuite, nous comparons cette distribution seuillée à celle correspondant aux NPs détectées correctement par le programme de traitement d'images. Insistons sur le fait que dans un premier temps nous ne nous intéressons pas aux erreurs commises sur la mesure du nombre de photons, *i. e.* que nous tenons compte uniquement des NPs détectées mais associées non pas aux nombres de photons estimés par le programme mais à celui de départ.

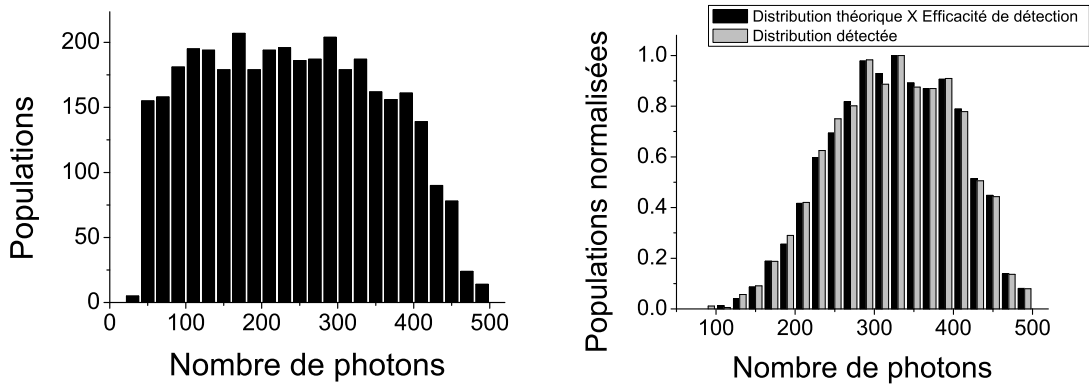


FIG. A.12 – Distribution théorique du nombre de photons émis par des NPs virtuelles (gauche). Comparatif des distributions obtenues par multiplication de l'efficacité de détection ($n_{sigma} = 2.5$) et la distribution théorique (noir) d'une part et la distribution calculée sur les NPs détectées (gris) d'autre part.

Sur la partie supérieure à 300 photons (Fig. A.12 à droite), on doit retrouver nécessairement la même forme de distribution dans la mesure où l'efficacité de détection est égale à 1. La partie intéressante concerne les nombres de photons inférieures à 300. Nous retrouvons pour les deux distributions exactement la même forme : ceci prouve que le programme détecte avec la même acuité des NPs de faibles luminosités présentes dans une image présentant des NPs de luminosité homogène et dans une image présentant des NPs de luminosité largement inhomogène.

Ceci est un point capital et à mettre au crédit de la technique de seuillage utilisée dans ce programme. En effet, comme le seuil n'est basé que sur l'estimation du signal de fond et de ses fluctuations, peu importe que la distribution du nombre de photons soit large ou étroite. En revanche, une technique de seuillage basée sur le signal des NPs aurait été complè-

tement dépendante de cette distribution et ceci aurait entraîné des erreurs différentes selon les caractéristiques de cette distribution.

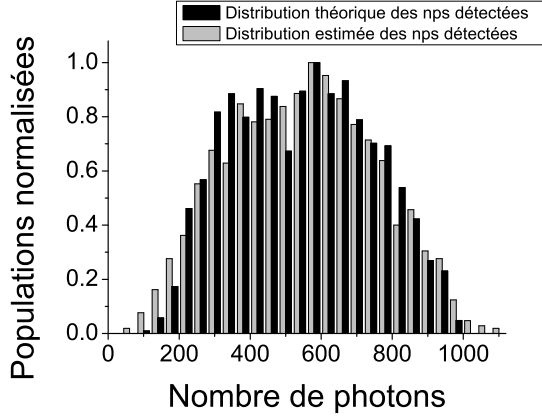


FIG. A.13 – Comparatif entre distribution du nombre de photons théorique multipliée par l'efficacité de détection (noir) et calculée (gris) pour les NPs détectées.

A présent, afin de comparer les distributions du nombre de photons théoriques et calculées, nous nous rapprochons du cas réel de l'expérience en créant une nouvelle distribution théorique plus large. Comme précédemment, nous créons une distribution homogène du nombre de photons répartie cette fois entre 50 et 1000 photons. On voit clairement sur la Fig. A.13 que l'accord est excellent tant au niveau des faibles que des fortes luminosités. Ceci démontre que notre programme rend compte d'une manière robuste de la distribution théorique du nombre de photons pour les NPs détectées et permet en outre de connaître précisément l'effet de seuil associé au signal de fond et conduit donc à distinguer un effet de seuil d'une forme de distribution réelle.

Pour être complet, il est utile de préciser qu'en aucune manière nous n'affirmons que le passage de la distribution théorique à celle calculée est de nature bijective.

En effet, sur la figure suivante (Fig. A.14), nous représentons à gauche l'histogramme normalisée de l'erreur commise sur chaque mesure du nombre de photons pour la distribution théorique précédente. Nous observons que les erreurs sont distribuées autour d'une valeur moyenne de -2.2% et avec un écart-type de 21%. Ainsi, comme à chaque mesure correspond une erreur, il ne peut y avoir de bijection entre ces deux distributions et donc la véritable précision du programme ne peut pas être mesurée en comparant simplement ces deux distributions. L'histogramme précédent correspond à la convolution de la distribution du nombre de photons avec celle de la distribution des erreurs pour chaque nombre de photons.

Sur la Fig. A.14 de droite, nous reportons l'erreur commise sur la mesure et l'écart-type

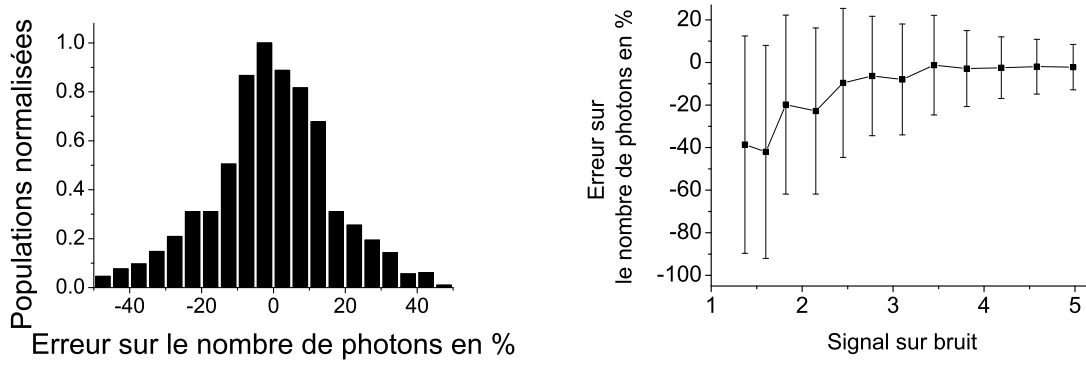


FIG. A.14 – Distribution des erreurs commises sur la mesure du nombre de photons pour la distribution de la Fig. A.12 (gauche). Evolution de l'erreur en fonction du rapport signal sur bruit. Ce rapport a été déduit point par point de la Fig. A.11 (gauche) pour $n_{sigma} = 2.5$.

associé en fonction du rapport signal sur bruit. Ainsi, comme nous connaissons pour chaque mesure l'erreur et la distribution des erreurs associée nous pouvons savoir a posteriori pour une distribution déterminée à l'aide du programme de traitement d'images à quel point la distribution réelle est correctement estimée. Concrètement, pour des distributions théoriques telles que la distribution précédente, il n'y aucune modification, plus précisément il n'y pas d'élargissement de la distribution. En revanche, pour des distributions centrées sur des nombres de photons plus faibles et présentant des écart-types plus faibles, il faudra tenir compte de cet effet.

Nous avons proposé dans cette annexe consacrée au traitement d'images une technique de seuillage basée sur la détermination du signal de fond et adaptée aux images que nous souhaitons traiter et qui possèdent comme caractéristiques : un signal de fond gaussien, un rapport signal sur bruit faible et une distribution de signaux large. La technique employée est basée essentiellement sur un filtrage laplacien qui permet d'accéder aux fluctuations du signal de fond. Le seuillage qui en découle permet de complètement s'affranchir des caractéristiques de la distribution du nombre de photons émis par les NPs. Pour déterminer l'efficacité de cette approche, nous avons utilisé des images théoriques reproduisant fidèlement les images expérimentales. Nous avons quantifié les erreurs sur la mesure du nombre de photons et comparé, favorablement, les distributions théoriques et calculées même en présence de NPs dont le rapport signal sur bruit est faible. Ceci a abouti à un programme robuste et entièrement automatisé.

Annexe B

Difficultés associées au couplage des NPs avec un "cross-linker"

Dans cette annexe, nous souhaitons tout d'abord soulever quelques questions générales relatives à la cinétique de la réaction entre des NPs et une molécule chargée, en l'occurrence le cross-linker BS³. Nous proposerons ensuite une étude bibliographique sur la réaction d'acylation conduite en solvant aqueux et en solvant organique. Nous concluerons alors sur la cinétique de cette réaction dans le cas du couplage des NPs aux BS³ réalisé dans du DMSO.

B.1 Considérations générales sur la réaction entre NPs et "cross-linker"

Pour aborder la cinétique d'une réaction dans un cadre général, il est intéressant d'étudier la théorie de Smoluchowski, étendue par Debye, portant sur les réactions bimoléculaires entre deux ions^[60]. Cette théorie étant rudimentaire, elle ne nous servira qu'à dégager les paramètres essentiels de ce type de réaction. Ceci nous permettra en outre de montrer les difficultés associées au couplage avec des NPs et avec ce type de surface de NPs.

B.1.1 Théorie de Smoluchowski et Debye

La théorie de Smoluchowski est basée sur l'hypothèse forte que la réaction entre deux molécules A et B intervient dès la première collision. On dit alors que la réaction est contrôlée

par la diffusion. Il est commode de représenter la molécule A par une sphère d'influence de rayon r_A et de supposer qu'une molécule B disparaît lorsque sa sphère d'influence de rayon r_B atteint la sphère d'influence de A. Le rayon de cette sphère est donc la somme de deux rayons, *i.e.* $\sigma = r_A + r_B$. Le coefficient de diffusion D_{AB} de B par rapport à A peut alors s'écrire simplement par $D_{AB} = D_A + D_B$.

En utilisant la première loi de Fick, on peut écrire que le gradient de concentration de l'espèce B, $\frac{d[B]}{dr}$, est proportionnel au flux J de molécules B traversant vers l'intérieur la surface sphérique de rayon r centrée sur A avec $r \gg \sigma$:

$$\frac{d[B]}{dr} = \frac{J}{4\pi r^2 D_{AB}} \quad (\text{B.1})$$

Cette équation peut alors facilement s'intégrer en notant que le flux J est indépendant de r et que $[B](\sigma) = 0$. De cette expression de $[B](r)$ et de la relation de Stokes-Einstein, on déduit l'expression de la constante de réaction, k , entre A et B (avec η la viscosité du milieu, k_B la constante de Boltzmann et T la température) :

$$k = 4\pi\sigma D_{AB} \quad (\text{B.2})$$

$$= 4\pi\sigma \frac{k_B T}{6\pi\eta} \left(\frac{1}{r_A} + \frac{1}{r_B} \right) \quad (\text{B.3})$$

Si les deux espèces sont chargées (charge $z_A e$ pour A et $z_B e$ pour B), il nous faut tenir compte dans la relation de Fick d'un terme supplémentaire lié à l'énergie potentielle $U(r)$. Cette théorie proposée par Debye amène pour $U(r) = \frac{z_A z_B e^2}{4\pi\epsilon r}$, à exprimer k comme précédemment mais avec un terme correctif σ_{eff} . Avec ϵ la permittivité du milieu, la constante de réaction s'écrit :

$$k = 4\pi\sigma_{eff} D_{AB} \quad (\text{B.4})$$

$$\sigma_{eff} = \frac{\alpha}{e^{\frac{\alpha}{\sigma}} - 1} \quad \text{et} \quad \alpha = \frac{z_A z_B e^2}{4\pi\epsilon k_B T}. \quad (\text{B.5})$$

B.1.2 Commentaires sur la réaction entre NPs et molécules chargées

A la suite de ce rapide développement, nous pouvons faire trois commentaires qualitatifs.

- Le premier est d'ordre général. Nous voyons apparaître les termes de diffusion qui dépendent directement de la taille des espèces A et B. Le protocole de conjugaison fourni par Pierce tient

compte d'un couplage entre protéines et BS^3 . On doit donc s'attendre dans le cas des NPs à une cinétique de réaction considérablement ralentie de l'ordre du rapport des rayons hydrodynamiques. Si nous pouvons nous placer en large excès de cross-linker, la réaction ne sera plus contrôlée par la diffusion ce qui conduit à minorer l'effet des rayons hydrodynamiques.

- Nous voyons aussi que la constante de réaction est inversement proportionnelle à la viscosité. Dans le DMSO, la réaction sera donc deux fois plus lente que dans l'eau ($\eta_{DMSO} = 2 \times \eta_{eau}$).
- Enfin, dans le cas d'ions on voit que le potentiel coulombien va jouer un rôle dans l'amorce de la réaction. Prenons tout d'abord le cas d'un solvant aqueux aux pH légèrement basiques (7 à 9). Le couple acido-basique $R-H_2SO_3/R-HSO_3^-$, présent dans le NHS sulfoné, a un pK_a proche de 2. Au pH de réaction, cette fonction sera sous la forme déprotonée et donc chargée. Le couple acido-basique $R-NH_3^+/R-NH_2$ de l'aminopropyltriéthoxysilane ayant un pK_a proche de 10, l'amine est sous une forme protonée *i.e.* chargée. Ceci correspond aux cas de la théorie de Debye où deux particules chargées sont de signes opposés ($\sigma_{eff} > \sigma$, effet attractif). On aura donc un effet positif sur la dynamique de la réaction. Qu'en est-il à présent dans le DMSO ?

Pour répondre à cette question il faudrait connaître le pK_a de tous ces couples dans le DMSO. A notre connaissance, aucun article ne propose les valeurs de ces pK_a . Nous nous contenterons alors de l'argument élémentaire suivant. Le DMSO n'étant pas acide, les formes protonées, $R-NH_3^+$, et déprotonées, $R-HSO_3^-$, des deux réactifs doivent être conservées et donc le rôle positif de l'attraction coulombienne sur la rapidité de la réaction.

Pour conclure sur cet effet du potentiel, nous voulons soulever une dernière question générale. Que se passe-t-il si nous considérons à présent le cas réel de la réaction entre la surface partiellement aminée des NPs et le NHS ester du BS^3 ?

Le pK_a de la silice polymérisée est acide autour de 2.2.^[18] Elle sera donc sous une forme déprotonnée négative ($R-SiO_3^-$). Ces charges négatives, identiques à celle du sulfonate et spatialement proches des amines (moins de 1 nm) devrait donc créer un potentiel coulombien répulsif supplémentaire qui diminue l'effet du potentiel attractif précédent. Une réponse pragmatique consisterait à dire que ce type de couplage est appliqué, avec succès, dans le cas des amines présentes dans les protéines pour lesquelles nous savons qu'il existe des acides aminés chargés négativement qui peuvent créer, là aussi, un potentiel environnant répulsif. Mais nous ajoutons aussitôt que les amines concernées sont celles qui sont accessibles, concept qui englobe d'une part l'encombrement stérique et d'autre part ce potentiel répulsif des acides

aminés environnants. La question demeure donc pertinente : qu'advient-il si l'ensemble des sites d'amines sont proches de sites chargées négativement ? Nous pouvons au moins dire qualitativement que cet effet aura un impact négatif sur l'accomplissement de la réaction.

Nous avons rapidement soulevé les difficultés associées à un couplage entre NPs et cross-linker. Cependant, nous n'avons pas tenu compte de la réaction spécifique entre le BS³ et les fonctions amines de la surface des NPs lorsque l'on conduit cette réaction dans un solvant organique. Or en chimie organique, le solvant est souvent un des éléments déterminants de la cinétique de la réaction. Par exemple, dans les substitutions nucléophiles de type 1 ou 2, le caractère protique ou aprotique du solvant joue un rôle considérable. Il nous faut donc mieux comprendre quel mécanisme réactionnel sous-tend le couplage que nous souhaitons utiliser.

B.2 Réaction d'acylation dans un solvant aqueux ou organique

Nous abordons dans cette section la réaction entre le NHS ester et l'amine de l'APTES. Nous allons présenter en détail les résultats obtenus par le groupe de Cline et Hanna.^[85;86] Ces résultats nous permettront de comprendre quel est le mécanisme réactionnel et quelles sont les étapes cinétiquement déterminantes pour l'accomplissement de la réaction dans un solvant aqueux ou dans un solvant organique. Nous rapprocherons alors ces résultats de nos conditions expérimentales afin de conclure sur la cinétique de la réaction d'acylation dans du DMSO.

Nous pensons que la fonctionnalisation des NPs aura, à n'en pas douter, de plus en plus recours à des approches chimiques plus poussées. Il est alors important de comprendre autant que faire se peut les moyens tant expérimentaux que théoriques à disposition de cette communauté afin d'établir les mécanismes réactionnels. Cette réaction en fournit une parfaite illustration. Nous irons donc plus loin que le simple exposé des résultats obtenus par ce groupe. Nous donnerons en outre les définitions communément admises par cette communauté.

La seconde motivation est de fournir un cadre de réflexion claire aux équipes du LOB, du LPMC et peut-être au delà pour améliorer la cinétique de cette réaction. Nous verrons en effet tant expérimentalement que théoriquement que cette réaction est considérablement ralentie dans le DMSO. Il faudra alors, pour la suite, imaginer des stratégies notamment catalytiques

pour accroître sa vitesse.

Nous rappelons ci-dessous la réaction globale d'acylation dans le cas de l'aminolyse par un NHS ester. Cette réaction fait partie des réactions de substitution nucléophile d'acyle. Le schéma réactionnel est celui d'une réaction d'addition-élimination. L'addition correspond à l'attaque par un réactif nucléophile d'un carbone appartenant à un dérivé d'acide carboxylique. Ceci aboutit à un état intermédiaire instable où le Carbone de l'acyle est tétrahédrique. Ensuite, l'élimination consiste au départ du groupe partant. Dans notre cas, le nucléophile est l'azote de l'amine qui compte tenu de son doublet d'électrons non-liants va pouvoir créer une liaison avec le carbone, électrophile, de l'acide carboxylique. Le groupe partant est le groupement N-hydroxysuccinimide.

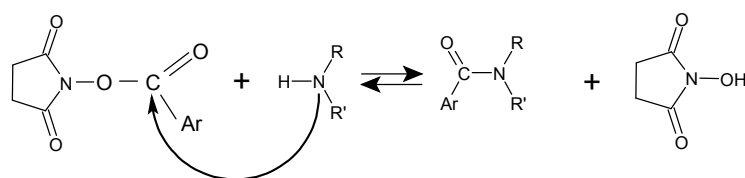


FIG. B.1 – Schéma global de l'aminolyse d'un NHS ester conduisant à l'expulsion du NHS et à la formation d'un amide. Ar signifie le groupe général aryle.

Nous commençons par l'étude de cette réaction dans un solvant organique.

B.2.1 Réaction d'acylation dans le 1,4 dioxane

Le premier article de Cline et Hanna publié en 1987 considère les réactions entre 12 amines de basicité et d'encombrement stérique différents et 4 acyles basés sur le benzoyl, activés par le N-hydroxysuccinimide ester. Ils réalisent en fait une étude "structure-réactivité" *i. e.* en utilisant différents types de réactifs, notamment en termes de pK_a , leur réactivité va être mesurée et le type de mécanismes réactionnels et les étapes cinétiquement déterminantes déduits. Nous allons dans un premier temps donner les définitions nécessaires à la compréhension de cette étude ainsi que les structures des réactifs utilisés.

Définitions

La basicité définie par la constante de basicité K_b est directement reliée au pK_a du couple que forme la base avec son acide conjugué selon la relation : $pK_a = 14 + \log(K_b)$ à 25° et 1 bar. Ainsi, on identifiera directement la basicité d'une amine au pK_a du couple.

Un acyle (R-CO) est un groupe fonctionnel dérivé d'un acide carboxylique (R-COOH) auquel on a enlevé l'hydroxyle. Nous discuterons essentiellement du benzoyle (C₆H₅CO) dérivé

de l'acide benzoïque, un acide carboxylique aromatique dérivé du benzène.

Le groupe aryle qui apparaît dans la figure précédente sous la forme "Ar" est un terme générique qui englobe tous les groupes fonctionnels dérivés des cycles aromatiques. Le benzyle par exemple est dérivé du benzène avec un éthyle sur un des carbones.

Ces réactions sont conduites dans du 1,4 dioxane. Ce solvant est, comme le DMSO, un solvant polaire aprotique. Un solvant polaire protique comme l'eau, l'éthanol ou l'acide acétique contient des liaisons O-H ou N-H conduisant à la création de liaisons hydrogènes entre les molécules de solvant et aussi de substrat. Plus généralement, ce type de solvant peut donner des ions H^+ qui stabilise les anions dissous. Un solvant polaire aprotique ne pourra donc pas former de liaisons hydrogènes, ni donner d'ions H^+ afin de stabiliser les anions.

Dans cet article, les auteurs mènent deux études basées sur des réactions compétitives entre deux couples de réactifs. Par exemple, ils font réagir deux amines avec une en excès par rapport à l'autre avec un acyle et ce de manière simultanée. Ils analysent ensuite les résultats en terme de constante de réaction relative en mesurant les différentes concentrations des produits par des techniques de séparation par HPLC.

Un point important est que toutes les réactions sont conduites en large excès d'amine afin de se placer dans des conditions de pseudo-ordre 1 en acyle. Les constantes de réaction observées (k_{obs}) dépendront alors de la concentration en amine ($k_{obs} = k_{réel}[Amine]$). La réaction de type bimoléculaire sera alors considérée comme ne dépendant que de la concentration en acyle et de k_{obs} ce qui conduit à l'expression "pseudo-ordre 1" en acyle.

Réactifs aminés utilisés

Cette réaction étant une substitution nucléophile, la basicité de l'amine joue un rôle prépondérant dans l'attaque nucléophile. Ce phénomène est bien connu depuis les années 50. En revanche, le lien qui existe entre les constantes de réaction et le pK_a des amines donne des informations spécifiques sur le mécanisme réactionnel et notamment permet de savoir si l'attaque nucléophile est l'étape limitante. On parle alors de lien entre la nucléophilie et la basicité de l'amine.

Les auteurs ont utilisé 12 amines de basicités différentes. Par souci de clarté, nous avons représenté les structures des amines ci dessous par ordre de pK_a croissant à l'aide du logiciel libre ChemSketch. Pour les amines primaires, cet échantillon a une gamme de pK_a allant de 4.6 pour l'aniline à 10.6 pour le n-butylamine. Il est étrange que certaines amines, réputées

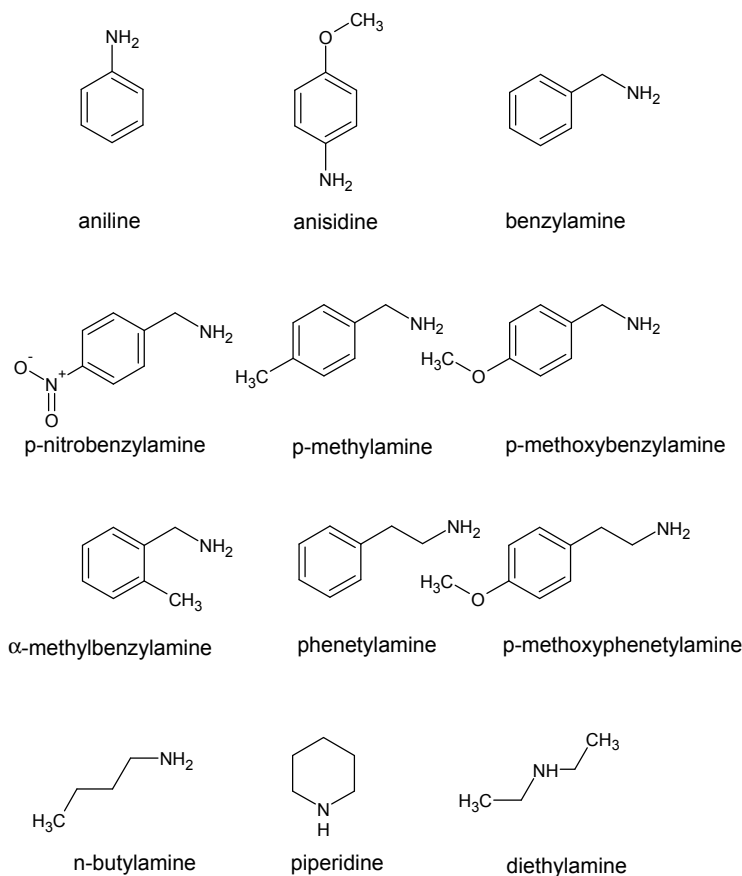


FIG. B.2 – Structure des 12 amines utilisées dans cette étude rangées par pK_a croissant

comme basiques, puissent avoir des pK_a d'acide faibles. Ceci s'explique comme suit.

La basicité d'une amine dépend de la disponibilité de la paire d'électrons non-liants de l'azote, des propriétés électroniques des substituants et du degré de solvation de la forme acide de l'amine. Pour l'effet des substituants, deux cas peuvent être considérés.

- Pour les substituants de type alkyle ($R=CH_3$, $CH_3-CH_2\dots$), la basicité est augmentée par rapport aux aryles. Ceci est lié essentiellement à l'effet inductif qui correspond à une propagation d'une polarisation électronique le long d'une chaîne d'atomes. En général, cet effet peut prendre deux formes dont les effets sont opposés. L'effet inductif positif (+I) qui correspond au cas des alkyles nécessite de la part de la chaîne d'atomes un effet donneur d'électrons. L'effet inductif négatif (-I) correspond au cas des aryles et à un effet attracteur d'électrons.
- Pour les substituants de type aryle, la basicité est diminuée. Ceci est lié d'une part à l'effet -I et d'autre part à l'effet mésomérique négatif. Cet effet mésomérique peut avoir là aussi deux effets opposés : $+M$ pour un effet donneur du cycle et $-M$ pour un

effet attracteur. Dans le cas d'un cycle aromatique, on a donc un effet $-M$ car la paire d'électrons peut se délocaliser sur le cycle par résonance.

Une dernière précision doit être faite sur la présence de groupes dits activateurs ou désactivateurs sur le benzène. Le groupe nitro (NO_2) est considéré comme un groupe de désactivation fort qui va baisser la densité électronique du cycle (Cf p-nitrobenzylamine). La présence de ce groupe induit donc une baisse de l'effet mésomérique et donc une diminution de la basicité. Inversement, le groupe ester OCH_3 est un activateur fort (Cf. p-méthoxybenzylamine).

Ces quelques rappels basiques permettent de comprendre en grande partie l'ordre des pK_a pour cet échantillon d'amines.

Réactifs acyles utilisés

Nous présentons ci-dessous la structure des acyles utilisés dans cette étude. Le même type

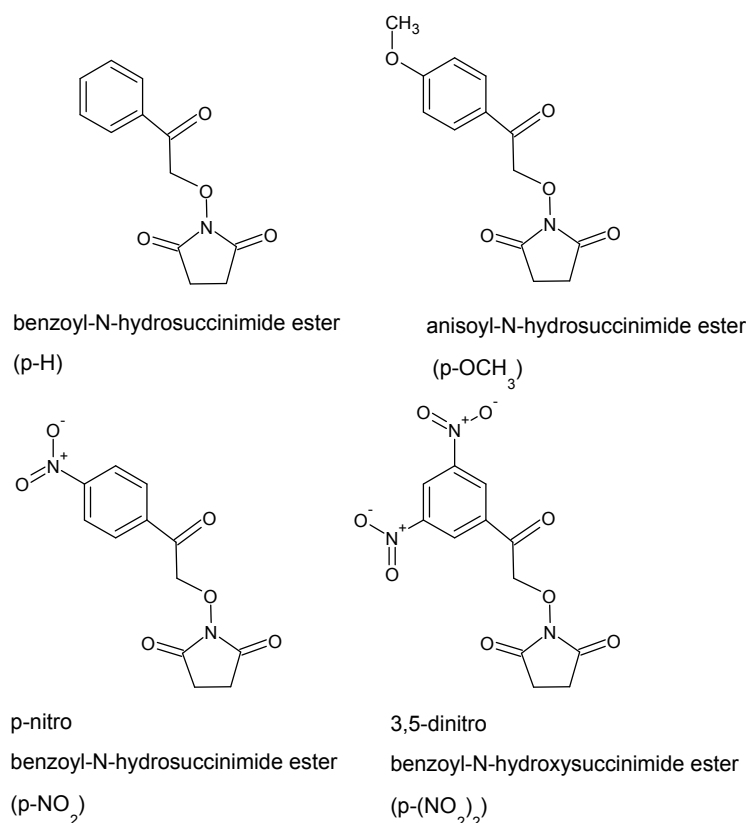


FIG. B.3 – Structure des benzoyl-NHS esters substitués par 4 groupements R différents (p-R).

de raisonnement peut être effectué sur la réactivité du carbone de l'acyle appartenant aux différents esters. La présence de groupes désactivateurs ou activateurs en position para du cycle va jouer sur la valeur de la charge δ^+ de ce carbone. Le groupe désactivateur le plus fort

est l'acyle noté p-3,5(NO₂)₂ dans la Fig. B.3.

Résultats sur les réactions entre chaque acyle et les différentes amines

Après cette présentation des réactifs, nous pouvons passer aux résultats obtenus en faisant réagir successivement les différentes amines sur chaque acyle. Les données les plus complètes portent sur l'acyle p-NO₂.

Cline et Hanna ont montré tout d'abord que la réactivité de l'amine avec le plus faible pK_a est environ 10000 fois inférieure à celle de plus fort pK_a.^[85] Ils montrent de plus que la réactivité relative des différentes amines primaires exprimée par log(k_{obs}) est linéairement dépendante du pK_a de ces amines et que la pente de cette droite β_{nuc} est égale à 0.73 (log(k_{obs}) = β_{nuc} pK_a). Ceci est le premier résultat important.

En écrivant la relation donnant β_{nuc} , ils réalisent en fait un graphique de type Bronsted qui relie la nucléophilie de l'amine avec sa basicité. De la valeur de cette pente, Jencks *et al* en 1967 ont déduit deux grands types de comportement pour la cinétique de la réaction et pour la répartition des charges sur l'état intermédiaire.^[143] Ceci a été effectué dans le cadre de l'aminolyse des esters avec comme groupe partant non pas des N-hydrosuccinimides mais des alkyles ou des phényles. Notons aussi que c'est dans ce cadre qu'a été démontrée la présence de l'état intermédiaire tétrahédrique pour les réactions d'aminolyse. Ces deux comportements sont les suivants.

- Pour des valeurs de β_{nuc} proches de 0.2, la nucléophilie est peu sensible aux changements de substituant sur l'amine. Ceci indique que l'amine a perdu peu de charges lorsqu'elle est dans l'état intermédiaire par rapport à son état en tant que réactif.^[143] On dit alors classiquement qu'il y a eu un développement d'une "charge faible" sur l'azote et que le groupe de l'état intermédiaire ressemble à celui en tant que réactif. On comprend alors que l'étape cinétiquement déterminante est la première étape de formation de l'état intermédiaire *i.e.* l'attaque du nucléophile et non pas la seconde étape de décomposition de l'état intermédiaire en produits.
- En revanche pour des valeurs de β_{nuc} supérieures à 0.5 et idéalement proches de 1, la nucléophilie est très sensible aux changements de substituent de l'amine. Ceci implique les conclusions inverses notamment le développement d'une charge positive importante sur l'amine et le fait que l'étape déterminante est cette fois la décomposition de l'état intermédiaire.

Ainsi, la valeur de 0.73 pour β_{nuc} indique que l'étape déterminante de la réaction d'acylation est la décomposition de l'état intermédiaire.

Pour être tout à fait précis, un autre β doit être pris en compte. Il représente le β_{lg} du groupe partant et correspond à la pente de la droite donnée par la dépendance du $\log(k_{obs})$ en fonction du pK_a du groupe partant. Les mêmes conclusions peuvent cependant être tirées et bien souvent les deux valeurs de β sont proches.^[143]

Constante de réaction absolue

Le deuxième résultat important est que Cline et Hanna ont pu quantifier les constantes de réaction absolues observées pour la réaction entre soit le n-butylamine soit la piperidine et l'ester p-OCH₃. Ces constantes de réaction montrent une dépendance avec deux composantes : une linéaire et l'autre quadratique avec la concentration en amine. Nous montrons les valeurs pour le n-butylamine.

$$k_{obs} = k_1[Amine] + k_2[Amine]^2 \quad (B.6)$$

$$k_1 = 3.9 \times 10^{-2} s^{-1} \quad (B.7)$$

$$k_2 = 1.4 \times 10^{-1} M^{-1} s^{-1} \quad (B.8)$$

L'apparition de cette non-linéarité est connue pour ce type de substitution nucléophile d'acyles et provient du rôle catalytique de l'amine dans cette réaction. Deux voies de réactions sont présentes : l'une non-catalysée (k_1) et l'autre catalysée par une base générale (k_2). Nous reviendrons dans la suite sur cet aspect.

Résultats sur les réactions entre chaque amine et les différents acyles

Le dernier résultat porte sur la réaction cette fois entre une amine et différents esters substitués.

Cline et Hanna ont montré que plus le benzoyle est substitué avec un groupe désactivateur fort plus la réaction est rapide. Comme précédemment, un formalisme permet à partir des constantes de réactions observées de remonter à des paramètres concernant l'état de transition. Le formalisme utilisé est celui d'Hammett.

En travaillant sur les substitutions d'acide benzoïque, Hammett a démontré l'existence d'une loi empirique reliant les constantes de réactions relatives à une référence, noté par k_0 ,

$(\frac{k}{k_0})$ aux deux paramètres suivants : l'un dépendant uniquement du substituant spécifique R (constante de substitution, σ), l'autre uniquement de la réaction (paramètre de la réaction, ρ). La relation d'Hammett s'écrit :

$$\log\left(\frac{k}{k_0}\right) = \sigma\rho. \quad (\text{B.9})$$

Connaissant les valeurs de σ pour chaque substituant, ils peuvent remonter au paramètre ρ dont la valeur est une indication sur la nature chargée de l'acyle lors de l'étape intermédiaire. La valeur est proche de 1.1 pour le benzylamine ce qui implique une grande sensibilité de la réaction à la présence du substituant sur le cycle et confirmerait d'après les auteurs un développement de charge sur l'acyle.

En utilisant les résultats précédents, un schéma réactionnel a été proposé et les étapes cinétiquement déterminantes identifiées. Deux voies sont possibles pour la seconde étape.

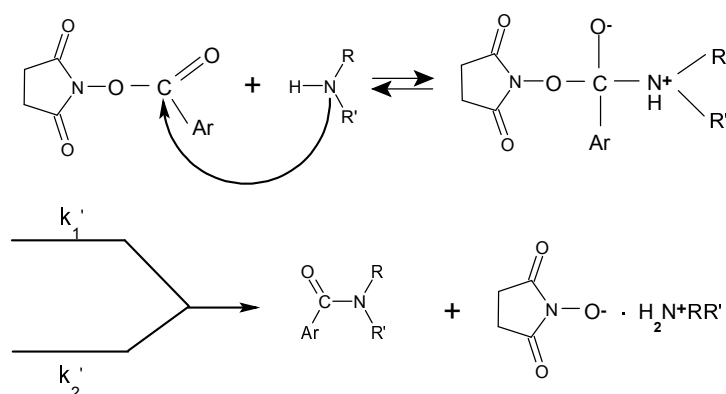


FIG. B.4 – Mécanismes réactionnel de l'aminolyse d'un NHS ester.

- La voie k_1 est la voie non catalysée : elle dépend uniquement de la concentration en amine. Des travaux faits sur les alkyles d'ester ont montré que dans ce cas tout à fait comparable à celui du NHS ester, l'étape déterminante était liée à la scission de la liaison acyle-oxygène.^[85]
- La voie k_2 est la voie catalysée par les amines et correspond au retrait d'un proton de l'azote. Cline et Hanna estiment tout comme dans le cas des alkyles et des phényles d'esters que ce retrait du proton est l'étape déterminante de cette voie.

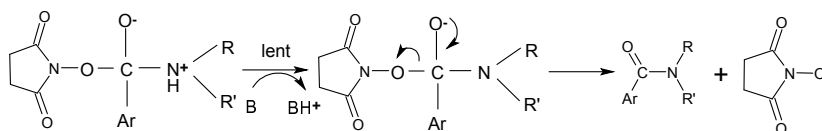


FIG. B.5 – Décomposition de l'état intermédiaire par voie catalytique basique.

Cline and Hanna ont aussi réalisé une autre étude "structure-réactivité" sur l'aminolyse des NHS ester mais cette fois en solvant aqueux.

B.2.2 Réaction d'acylation en solvant aqueux

Les auteurs ont étudié la réactivité de l'anisoyle-NHS ester avec des amines de pK_a différents dans un solvant aqueux avec 20% en volume de 1,4 dioxane. Les structures des réactifs sont représentées ci-dessous. Notons que les acyles avec leur charge δ^+ sur le carbone ont

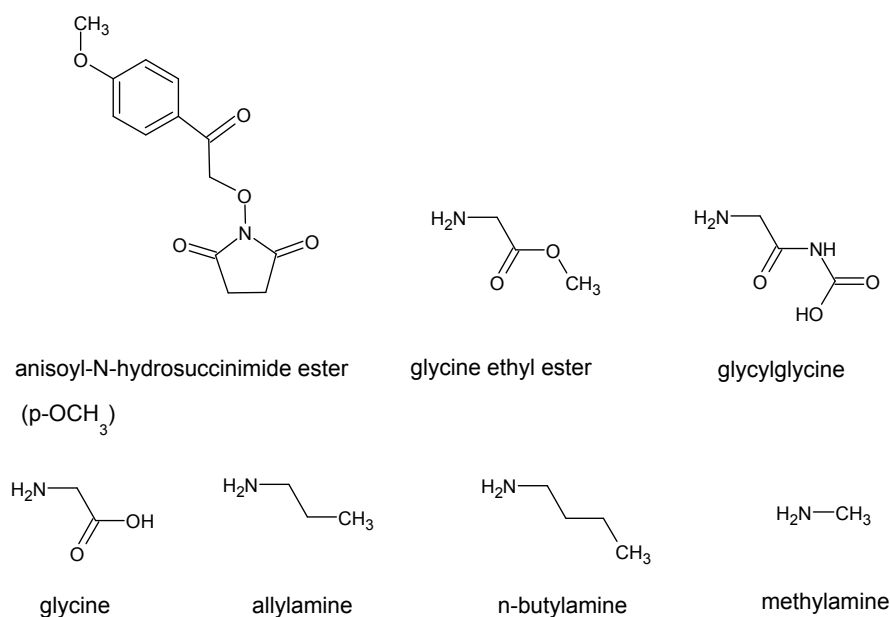


FIG. B.6 – Structure des réactifs lors de l'aminolyse du benzoyle-NHS ester (pK_a croissant de 7.75 pour le glycine éthyl ester à 10.63 pour le méthylamine).

une basicité plus faible que l'équivalent en alkyle par effet inductif négatif. Les constantes de réaction absolues ont été déterminées pour chaque couple de réactifs dans des conditions de pseudo-ordre 1 en acyle en se plaçant en large excès d'amines et les auteurs suivent la décomposition de l'ester.

Nous allons étudier les deux réactions mentionnées dans cet article : la première correspond à l'hydrolyse de l'ester *i.e.* à la réaction naturelle des esters avec le solvant aqueux sans autre nucléophile présent, la seconde correspond à la réaction d'aminolyse qui nous intéresse.

Réaction d'hydrolyse de l'ester

Il est connu que les esters peuvent s'hydrolyser en solvant aqueux basique.^[143] Jencks *et al* ont d'ailleurs trouvé les constantes de réaction pour la décomposition des esters dans le cadre plus général de l'attaque nucléophile par des oxyanions dont OH^- fait partie. En étudiant notamment les pK_a des acides conjugués de ces oxyanions et les pentes β_{nuc} et β_{lg} , ils ont montré que deux types d'état intermédiaire pouvaient être formés selon la différence de pK_a

entre le groupe partant, dans notre cas le NHS ester et dans le leur des alkyles d'ester, et le nucléophile, dans notre cas OH^- et dans le leur une classe plus générale d'oxyanions.

Si β_{nuc} est proche de 0.3, l'état intermédiaire est proche de celui des réactifs, l'étape limitante est celle de l'attaque nucléophile et le pK_a du nucléophile est supérieur à celui du groupe partant (et inversement si β_{lg} est proche de 1). Ce dernier point correspond donc à la situation inverse de l'attaque par un nucléophile tel qu'une amine où des valeurs de β_{nuc} proche de 0.2 sont un corollaire d'un pK_a de l'espèce attaquante plus faible que le pK_a du groupe partant.

Ainsi, pour l'hydrolyse du NHS ester, la constante de réaction observée (k_{obs}) est du premier ordre en OH^- et s'écrit :

$$k_{obs} = k_{OH^-} [OH^-] \quad (B.10)$$

$$k_{OH^-} = 87 M^{-1} s^{-1} \quad (B.11)$$

Quelques ordres de grandeur peuvent nous aider à comprendre l'importance de ce phénomène. A $pH = 7$, le temps de demi vie du NHS ester est de 1380 min, à $pH=7.5$ de 419 min, à $pH=8$ de 132 min, à $pH=8.5$ de 42 min et à $pH=9$ seulement de 13 min. Tournier *et al* rapportent un k_{OH^-} de $203 M^{-1} s^{-1}$ pour un sulfo-NHS ester présent à une des extrémités d'un cross-linker hétérobifonctionnel avec un hexane séparant les deux groupements activés.^[144] Staros *et al* rapportent un k_{OH^-} de $173 M^{-1} s^{-1}$ pour un sulfo-NHS agissant sur un propionyle.^[87]

Réaction d'aminolyse de l'ester

En présence d'amines, le k_{obs} est la somme de l'hydrolyse et de l'aminolyse de l'anisoyl-NHS ester. Contrairement au cas du dioxane anhydre, le k_{obs} dépend uniquement de la concentration en amine et non plus de la concentration en amine au carré. De plus, le k_{obs} ne dépend pas de la concentration en amine totale mais uniquement de la concentration en amine libre. Ce terme amine libre fait référence à l'amine déprotonée. En utilisant la relation suivante, nous pouvons calculer cette concentration en amine libre $[Amine]_{libre}$.

$$pK_a = -\log\left(\frac{[Amine]_{libre}[H^+]}{[Amine]_{protonée}}\right) \quad (B.12)$$

$$[Amine]_{libre} = \frac{[Amine]_{totale}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (B.13)$$

La relation donnant k_{obs} en fonction de la constante de réaction de la réaction d'aminolyse k_1 s'exprime comme (valeur de k_1 pour la n-butylamine) :

$$k_{obs} - k_{OH^-}[OH^-] = k_1 [Amine]_{libre} \quad (B.14)$$

$$k_1 = 50.9 M^{-1} s^{-1}. \quad (B.15)$$

Ce k_1 , dépendant linéairement de $[Amine]_{libre}$, correspond donc à la voie non-catalytique observée dans le dioxane anhydre. A partir de la relation B.10, nous pouvons déduire le rapport des vitesses d'avancement des réactions d'aminolyse, ν_A , et de l'hydrolyse, ν_H de l'anisoyle NHS ester (ANHS).

$$\nu_H = \frac{d[ANHS]}{dt} = -k_{OH^-}[OH^-][ANHS] \quad (B.16)$$

$$\nu_A = \frac{d[ANHS]}{dt} = -k_1[Amine]_{libre}[ANHS] \quad (B.17)$$

$$\frac{\nu_A}{\nu_H} = \frac{k_1}{k_{OH^-}} \cdot \frac{[Amine]_{totale}}{10^{pH} + 10^{pK_a}} \cdot 10^{14} \quad (B.18)$$

Ce rapport en fonction du pH donne une sigmoïde décroissante centrée sur la valeur du pK_a de l'amine. Pour une amine de pK_a de 10.25 (APTES) et une concentration en amine de 1 M, ce rapport vaut 3300 pour un pH égal à 7.4.

Enfin, le dernier résultat obtenu par Cline et Hanna constitue la désormais classique étude de structure-réactivité du nucléophile.

Ils trouvent que le β_{nuc} vaut 1, ceci implique que l'étape déterminante est la décomposition de l'état intermédiaire tétrahédrique. Ceci nous amène directement à la partie la plus intéressante, pour notre application, de cette étude.

Si nous comparons les deux valeurs de k_1 dans le dioxane anhydre et dans le solvant aqueux, nous voyons un facteur 1300 qui implique un ralentissement considérable de la réaction dans le dioxane.

Le fait de n'observer aucune contribution de la voie catalytique (absence de contribution quadratique dans le cas du solvant protique) est une indication de la disproportion entre la voie non-catalysée k'_1 et celle catalysée k'_2 (Cf. Fig. B.4). Dans un solvant protique tel que l'eau, les transferts de proton via le solvant et la stabilisation des anions par les liaisons hydrogènes vont considérablement faciliter respectivement l'élimination de la charge résiduelle de l'azote et l'expulsion du NHS. La voie k'_1 sera donc favorisée. Ainsi, dans la mesure où l'étape

cinétiquement déterminante est justement l'étape de décomposition de l'état intermédiaire qui nécessite à la fois la déprotonation de l'amine et l'expulsion du NHS ester, on comprend bien l'origine de ce considérable ralentissement de la cinétique de la réaction dans le dioxane anhydre.

De plus, le rapport des deux constantes de réactions ($\frac{k'_1}{k_2}$) va être lié aux capacités relatives de départ du NHS et de l'amine de l'état intermédiaire. Plus le pK_a du groupe sera faible et plus le groupe sera un bon partant.^[145] Ainsi, dans le cas du NHS ester ($pK_a = 6$), toutes les amines ayant un pK_a supérieur, comme c'est le cas pour le n-butylamine ($pK_a = 10.6$), aboutiront à une expulsion facilitée du NHS et donc à un recours moins important, en solvant aqueux, à la voie catalysée.^[146]

De cette rapide incursion en chimie organique, nous pouvons faire le résumé suivant. La cinétique de la réaction est ralentie d'un facteur 1300 par passage d'un solvant aqueux au dioxane du fait du caractère aprotique de ce dernier. Dans les deux solvants, le mécanisme réactionnel d'acylation de l'ester par une amine comporte un état intermédiaire tétrahédrique dont la décomposition en produits est l'étape cinétiquement limitante. Dans le dioxane, deux voies de décomposition ont été trouvées : l'une catalysée par une base (l'amine), d'ordre 2 en amine et l'autre non-catalysée, d'ordre 1 en amine. La voie catalysée est limitée par l'expulsion du proton sur l'azote de l'état intermédiaire tandis que la voie non-catalysée est limitée par l'expulsion de l'ester. Dans l'eau, l'ester peut soit réagir par voie non-catalytique avec une amine afin de donner l'amide désirée soit perdre sa réactivité par hydrolyse en milieu basique.

La question est à présent de savoir si nous pouvons appliquer ces résultats au cas de la réaction du sulfo-NHS ester présent dans le BS³ avec l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) présent à la surface des NPs.

B.2.3 Réaction d'acylation entre l'APTES et le BS³

Nos conditions expérimentales sont différentes de celles précédentes sur au moins quatre points. Nous utilisons comme solvant le DMSO au lieu du dioxane. Les résultats précédents portent essentiellement sur l'étude des dérivés du NHS ester de benzoyle alors que nous utilisons un NHS ester d'une part sulfoné et d'autre part relié à une chaîne carbonée proche du propyle. Enfin, dans notre cas nous utilisons une aminopropyle alors que précédemment l'amine la plus proche structurellement est la butylamine.

Comme nous l'avons mentionné, le point important concernant la diminution de la réactivité due à l'échange de solvant est le caractère aprotique du dioxane. Le DMSO étant aussi un solvant polaire aprotique, nous pouvons considérer que son utilisation a un effet similaire sur la cinétique de la réaction.

Le sulfonate placé en substituant d'un hydrogène sur le succinimide modifie la solubilité du BS³ mais ne modifie pas son pK_a qui est le paramètre déterminant dans la décomposition de l'état intermédiaire.

Le passage benzoyle-propyle doit être apprécié, en revanche, avec plus de précautions. En effet, la valeur du paramètre de Hammett ρ égale à 1.1 indique que cette réaction d'acylation est sensible à la présence de substituant sur le benzoyle. Nous avons observé que plus le substituant était désactivateur plus la réactivité était forte. Autrement dit, plus cette chaîne carbonée attire les charges du carbone de l'acyle plus la réactivité est forte. Dans le cas des aryles, un effet mésomérique négatif se combinera à un effet inductif négatif desquels résultera une forte attraction des charges et donc une plus grande réactivité que dans le cas des alkyles où on retrouvera un effet inductif positif. Nous en déduisons que la réactivité globale du BS³ doit être moins importante que celle trouvée pour l'ester de benzoyle. En revanche, cette baisse de réactivité touchera de la même manière la réaction dans l'eau et dans le DMSO ce qui conduit à penser que cela n'aura pas d'effet sur la baisse de réactivité relative dans le DMSO.

Enfin, l'aminopropyle et l'aminobutyle ayant des pK_a très proches ($\delta pK = 0.04$) ceci n'aura pas d'incidence sur la réactivité.

Une bonne partie des conclusions précédentes peut donc être conservée pour nos conditions expérimentales et notamment celle sur une réactivité beaucoup plus faible dans le DMSO. Il faudra donc augmenter considérablement le temps de réaction d'une heure préconisé par le fournisseur du cross-linker pour un solvant aqueux. Il faudra de plus rajouter une base dans le mélange réactionnel. En effet, une partie de la décomposition de l'état intermédiaire se fait selon une catalyse basique générale, l'amine jouant le rôle de réactif et de catalyseur. Or dans le cas des NPs, les amines qui pourraient jouer le rôle de catalyseur sont fixées à la surface des NPs. Il serait alors hautement improbable que ce mécanisme puisse être conservé. Nous devons donc rajouter une base afin que la déprotonation de l'ammonium appartenant à l'état intermédiaire puisse se faire. Jencks *et al* ont montré à ce sujet que dans la réaction d'aminolyse entre l'hydrazine (amine=hydrazine) et l'ester p-chlorophényle

acétate (groupe partant=p-chlorophényle), un ajout de triéthylènediamine qui joue le rôle de base peut catalyser cette réaction.^[146] Nous avons choisi d'utiliser la triéthylamine comme base supplémentaire.

Bibliographie

- [1] A. H. Coons, H. J. Creech, and R. Jones. *Proc. Sec. Exp. Biol. Med.*, 47 :2000, 1941.
- [2] A. Van Blaaderen and A. Vrij. *Langmuir*, 8 :2921, 1992.
- [3] H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, and U. Wiesner. *Nano Lett.*, 5 :113, 2005.
- [4] A. Burns, O. Hooisweng, and U. Wiesner. Fluorescent core-shell silica nanoparticles : towards "lab on a particle" architectures for nanobiotechnology. *Chem. Soc. Rev.*, 35 :1025, 2006.
- [5] O. Shimomura, F. H. Johnson, and Y. Saiga. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59 :223, 1962.
- [6] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, and M. J. Cormier. *Gene*, 111 :229, 1992.
- [7] R. Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67 :509, 1998.
- [8] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. *Science*, 263 :802, 1994.
- [9] W. C. W. Chan, X. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han, and S. Nie. *Current opinion in Biotechnol.*, 13 :40, 2002.
- [10] C. B. Murray, D. J. Norris, and M. G. Bawendi. *J. Am. Chem. Soc.*, 115 :8706, 1993.
- [11] I. L. Medintz, U. Tetsuo, E. R. Goldman, and H. Mattoussi. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Materials*, 4 :435, 2005.

- [12] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307 :538, 2005.
- [13] W. C. W. Chan and S. M. Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281 :2016, 1998.
- [14] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 281 :2013, 1998.
- [15] M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single quantum dot tracking. *Science*, 302 :442, 2003.
- [16] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, and S. N. Bhatia. *Nano Lett.*, 4 :11, 2004.
- [17] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. Munos Javier, H. E. Gaub, S. Stolzle, N. Fertig, and W. J. Parak. *Nano Lett.*, 5 :331, 2005.
- [18] Domitille Giaume. *Nanoparticules d'orthovanadate d'yttrium : fonctionnalisation et application comme sondes luminescentes pour la biologie*. PhD thesis, 2006.
- [19] G. Blasse and B. C. Grabmaier. *Luminescent materials*. Springer-Verlag, 1994.
- [20] A. Huignard, T. Gacoin, and J. P. Boilot. Synthesis and luminescence properties of colloidal YVO₄ : Eu phosphors. *Chem. Mat.*, 12 :1090, 2000.
- [21] A. Huignard, V. Buissette, G. Laurent, T. Gacoin, and J. P. Boilot. Synthesis and characterizations of YVO₄ : Eu colloids. *Chem. Mat.*, 14 :2264, 2002.
- [22] A. Huignard, V. Buissette, A. C. Franville, T. Gacoin, and J. P. Boilot. Emission processes in YVO₄ : Eu nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 107 :6754, 2003.
- [23] O. Guillot-Noel, A. Kahn-Harari, B. Viana, D. Vivien, E. Antic-Fidancev, and P. Porcher. *J. Phys. : Condensed Matter*, 10 :6491, 1998.
- [24] K. Simons and E. Ikonen. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387 :569, 1997.

- [25] D. Casanova, D. Giaume, E. Beaupaire, T. Gacoin, J. P. Biolot, and A. Alexandrou. Optical in-situ size determination of single lanthanide-ion doped oxide nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.*, 89 :253103, 2006.
- [26] D. Casanova, D. Giaume, T. Gacoin, J. P. Boilot, and Alexandrou A. Single lanthanide-doped oxide nanoparticles as donors in fluorescence resonance energy transfer experiments. *J. Phys. Chem. B.*, 110 :19264, 2006.
- [27] D. Casanova, D. Giaume, M. Moreau, J. L. Martin, T. Gacoin, J. P. Boilot, and A. Alexandrou. Counting the number of proteins coupled to single nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 129 :12592, 2007.
- [28] E. Beaupaire, V. Buissette, D. Sauviat, M. P. Giaume, K. Lahlil, A. Mercuri, D. Casanova, A. Huignard, J. L. Martin, T. Gacoin, J. P. Boilot, and A. Alexandrou. Functionalized fluorescent oxide nanoparticles : Artificial toxins for sodium channel targeting and imaging at the single-molecule level. *Nano Lett.*, 4 :2079, 2004.
- [29] M. Nirmal, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, and T. D. Harris. Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. *Nature*, 383 :802, 1996.
- [30] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hammann, A. Gallagher, and D. J. Nesbitt. Nonexponential "blinking" kinetics of single cdse quantum dots : A universal power law decay. *Phys. Rev. B*, 66 :233202, 2002.
- [31] R. Verbeck, A. M. Van Oijen, and M. Orrit. Simple model for the power-law blinking of single semiconductor nanocrystals. *Phys. Rev. B*, 66 :233202, 2002.
- [32] X. Brockmann, J. P. Hermier, J. G. Messin, P. Desbiolles, J. P. Bouchaud, and M. Dahan. Statistical aging and nonergodicity in the fluorescence of single nanocrystals. *Phys. Rev. Lett.*, 90 :120601, 2003.
- [33] Y. Jung, E. Barkai, and R. J. Silbey. Lineshape theory and photon counting statistics for blinking quantum dots : a levy walk process. *Chem. Phys.*, 284 :181, 2002.

- [34] B. C. Lagerholm, L. Averett, G. E. Weinreb, K. Jacobson, and N. L. Thompson. Analysis method for measuring submicroscopic distances with blinking quantum dots. *Biophys. J.*, 91 :45, 2006.
- [35] P. Michler, A. Imamoglu, M. D. Mason, P. J. Carson, G. F. Strousse, and S. K. Buratto. Quantum correlation among photons from a single quantum dot at room temperature. *Nature*, 406 :968, 2000.
- [36] T. Basche, W. E. Moerner, M. Orrit, and T. Talon. Photon antibunching in the fluorescence of a single dye molecule trapped in a solid. *Phys. Rev. Lett.*, 69 :1516, 1992.
- [37] Arnaud Huignard. *Nanoparticules de vanadate d'yttrium : synthèse colloïdale et luminescence des ions lanthanides*. PhD thesis, 2001.
- [38] R. C. Powell and G. Blasse. *Energy transfer in concentrated materials, structure and bonding*. Springer-Verlag, 1980.
- [39] S. Shionoya and W. M. Yen. *Phosphor handbook*. CRC press, Boca raton, 1999.
- [40] Y. Haas and G. Stein. Radiative and nonradiative pathways in solutions. Excited states of the europium(iii) ion. *J. Phys. Chem.*, 76 :1093, 1972.
- [41] C. Zander, J. Enderlein, and R. A. Keller. *Single molecule detection in solution*. Wiley Vch, 2001.
- [42] J. Widengren and P. Schwille. Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, 104 :6416, 2000.
- [43] D. N. Dempster, T. Morrow, R. Rankin, and G. F. J. Thompson. *Chem. Soc. Faraday Trans.*, 68 :1479, 1971.
- [44] J. Widengren, U. Mets, and R. Rigler. Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Chem. Phys.*, 250 :171, 1999.
- [45] M. Bates, T. R. Blosser, and X. Zhuang. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. *Phys. Rev. Lett.*, 94 :108101, 2005.

- [46] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, and P. Tinnenfeld. Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 :3801, 2005.
- [47] M. Rust, M. Bates, and X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Meth.*, 3 :793, 2006.
- [48] M. Bates, G. T. Dempsey, and X. Zhuang. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 317 :1749, 2007.
- [49] M. N. Berberan-Santos, E. N. Bodunov, and B. Valeur. Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions 1. Kohlrausch decay function (stretched exponential). *Chem. Phys.*, 315 :171, 2005.
- [50] Y. Zhou and X. Zhuang. Robust reconstruction of the rate constant distribution using the phase function approach. *Biophys. J.*, 91 :4045, 2006.
- [51] L. Pavesi and M. Ceschini. *Phys. Rev. B*, 48 :17625, 1993.
- [52] M. N. Berberan-Santos, E. N. Bodunov, and B. Valeur. Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions : 2. Becquerel (compressed hyperbola) and related decay functions. *Chem. Phys.*, 317 :57, 2005.
- [53] J. Wlodarczyk and B. Kierdaszuk. Interpretation of fluorescence decays using a power-like model. *Biophys. J.*, 85 :589, 2003.
- [54] R. Suzuki, S. Takei, E. Tashiro, and K. I. Machida. Photo-reduction behavior of solgel derived silica materials doped with europium crown ether complex. *Journal of Alloys and Compounds*, 408 :800, 2006.
- [55] O. S. Wolfbeis, A. Duerkop, M. Wu, and Z. Lin. Europium ion-based luminescent sensing probe for hydrogen peroxide. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 :525, 2002.
- [56] H. Schmalzried. *Chemical kinetics of solids*. VCH, 1995.
- [57] B. Q. Hu, Y. Z. Zhang, X. Wu, and X. L. Chen. Defects in large single crystals Nd : YVO₄. *Journal of Crystal Growth*, 226 :511, 2001.

- [58] W. Ryba-Romanowski, S. Golab, P. Solarz, G. Dominiak-Dzik, and T. Lukasiewicz. Anti-stokes emission in undoped YVO₄. *Appl. Phys. Lett.*, 80 :1183, 2002.
- [59] O. T. Sorensen. *Non-stoichiometric oxides*. Academic press, 1981.
- [60] Sam Logan. *Introduction à la cinétique chimique*. Dunod, 1998.
- [61] Max Brousseau. *Les défauts ponctuels dans les semiconducteurs*. Les éditions de physique, 1988.
- [62] B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, and M. G. Bawendi. *J. Phys. Chem. B*, 101 :9463, 1997.
- [63] C. C. Chen, C. P. Yet, H. N. Wang, and C. Y. Chao. *Langmuir*, 15 :6845, 1999.
- [64] K. R. Brown, D. G. Walter, and M. J. Natan. *Chem. Mater.*, 12 :306, 2000.
- [65] J. Sharma, S. Mahima, B. A. Kakade, R. Pasricha, A. B. Mandale, and K. Vijayamohan. *J. Phys. Chem. B*, 108 :13280, 2004.
- [66] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier. *Discuss. Faraday Soc.*, 11 :55, 1951.
- [67] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, page 801, 1994.
- [68] C. J. Ackerson, P. D. Jadzinsky, and R. D. Kornberg. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 :6550, 2005.
- [69] F. Meiser, C. Cortez, and F. Caruso. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43 :5954, 2004.
- [70] S. Kim and M. G. Bawendi. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 :14652, 2003.
- [71] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, and M. G. Bawendi. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 :12142, 2000.
- [72] Y. Liu, M. Kim, Y. Wang, Y. A. Wang, and Peng. X. *Langmuir*, 22 :6341, 2006.
- [73] W. Guo, J. J. Li, Y. A. Wang, and X. Peng. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 :3901, 2003.
- [74] A. Swani, A. Kumar, and M. Sastry. *Langmuir*, 19 :1168, 2003.

- [75] N. Lala, A. G. Chittiboyana, S. P. Chavan, and M. Sastry. *Langmuir*, 17 :3766, 2001.
- [76] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, and A. Libchaber. *Science*, 298 :1759, 2002.
- [77] C. Mangeney, F. Ferrage, I. Aujard, V. Marchi-Artzner, L. Jullien, R. El Djouhar, A. Laschewsky, I. Vikholm, and J.W. Sadowski. *J. Am. Chem. Soc.*, 124 :5811, 2002.
- [78] P. Mulvaney, L. M. Liz-Marzan, M. Giersig, and T. Ung. *J. Mater. Chem.*, 10 :1259, 2000.
- [79] T. Ung, L. M. Liz-Marzan, and P. Mulvaney. *Langmuir*, 14 :3740, 1998.
- [80] E. Matijevi. *langmuir*, 10 :8, 1994.
- [81] C. Flesch, M. Joubert, E. Bourgeat-Lami, S. Mornet, E. Duguet, C. Delaite, and P. Dumas. *Coll. Surf. A*, 262 :150, 2005.
- [82] D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, and A. P. Alivisatos. *J. Phys. Chem. B*, 105 :8861, 2001.
- [83] W. Stöber, A. Fink, and E. Bohn. *J. Coll. Inter. Sci.*, 26 :62, 1968.
- [84] J. Th. G. Overbeek. *Colloidal dispersions*. The royal society of chemistry, 1982.
- [85] G. W. Cline and S. B. Hanna. The aminolysis of n-hydrosuccinimide esters. A structure-reactivity study. *J. Am. Chem. Soc.*, 109 :3087, 1986.
- [86] G. W. Cline and S. B. Hanna. Kinetics and mechanism of the aminolysis of n-hydrosuccinimide esters in aqueous buffer. *J. Org. Chem.*, 53 :3583, 1988.
- [87] P. S. R. Anjaneyulu and J. V. Staros. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 30 :117, 1987.
- [88] G. S. Harms, L. Cognet, P. M. H. Lommerse, G. A. Blab, H. Kahr, R. Gamsjager, H. P. Spaink, N. M. Soldatov, C. Romanin, and T. Schmidt. Single-molecule imaging of the H-ras membrane-anchor reveals domains in the cytoplasmic leaflet of the cell membrane. *Biophys. J.*, 81 :2639, 2001.
- [89] M. P. Gordon, T. Ha, and P. R. selvin. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101 :6462, 2004.

- [90] S. G. Rhee. A necessary evil for cell signaling. *Science*, 312 :1882, 2006.
- [91] M. Sundaresan. *Science*, 270 :296, 1995.
- [92] S. Simizu. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J. Cell Biol.*, 273 :26900, 1998.
- [93] K. Griendling, K. Sorescu, and M. Ushio-Fukai. NADPH oxidase : role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 86 :494, 2000.
- [94] T. M. Paravicini and R. M. Touyz. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 71 :247, 2006.
- [95] R. E. Clempus and K. K. Griendling. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.*, 71 :216, 2006.
- [96] K. Bedard and K. H. Krause. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases : physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, 87 :245, 2007.
- [97] C. H. Chen, T. H. Cheng, H. Lin, N. L. Shih, Y. L. Chen, Y. S. Chen, C. F. Cheng, W. S. Lian, T. C. Meng, W. T. Chiu, and J. J. Chen. Reactive oxygen species generation is involved in epidermal growth factor receptor transactivation through the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase in endothelin-1 signaling pathway in rat cardiac fibroblasts. *Mol. Pharmacol.*, 69 :1347, 2006.
- [98] C. Y. Okada and M. Rechsteiner. Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytic vesicles. *Cell*, 29 :33, 1982.
- [99] C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, and S. C. Bondy. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 5 :227, 1992.
- [100] E. Marchesi, C. Rota, Y. C. Fann, C. F. Chignell, and R. P. Mason. Photoreduction of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein : a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 :525, 2002.

- [101] C. Rota, Y. C. Fann, C. F. Chignell, and R. P. Mason. Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase : possible consequences for oxidative stress measurements. *J. Biol. Chem.*, 274 :28161, 1999.
- [102] M. Wu, Z. Lin, and O. S. Wolfbeis. Determination of the activity of catalase using a europium(iii)-tetracycline-derived fluorescent substrate. *Anal. Biochem.*, 320 :129, 2003.
- [103] V. V. Belousov, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazzov, A. V. Terskikh, and S. Lukyanov. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Meth.*, 3 :281, 2006.
- [104] Meng Wu. *Time-resolved quantitative assays and imaging of enzymes and enzyme substrate using a new europium fluorescent probe for hydrogen peroxyde*. PhD thesis, 2003.
- [105] N. Makino, M. Mochizuki, S. Bannai, and Y. Sugita. Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 269 :1020, 1994.
- [106] G. P. Bienert, J. K. Schjoerring, and T. P. Jahn. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758 :994, 2006.
- [107] T. H. Cheng, N. L. Shih, S. Y. Chen, D. L. Wang, and J. J. Chen. Reactive oxygen species modulate endothelin-1-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.*, 41 :654, 1999.
- [108] l. Li and et al. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin-1 NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*, 107 :1053, 2003.
- [109] G. Bou Daou and A. K. Srivastava. Reactive oxygen species mediate endothelin-1-induced activation of ERK1-2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 37 :208, 2004.
- [110] C. M. Cheng, H. J. Hong, J. C. Liu, N. L. Shih, S. H. Juan, S. H. Loh, P. Chan, J. J. Chen, and T. H. Cheng. Crucial role of extracellular signal-regulated kinase pathway in reactive oxygen species-mediated endothelin-1 gene expression induced by endothelin-1 in rat cardiac fibroblasts. *Mol. Pharmacol.*, 63 :1002, 2003.

- [111] P. N. Seshiah, D. S. Weber, P. Rocic, L. Valppu, Y. Taniyama, and K. K. Griendling. Angiotensin 2 stimulation of NADPH oxidase activity : Upstream mediators. *Circ. Res.*, 91 :406, 2002.
- [112] N. Makino, K. Sasaki, K. Haschida, and Y. sakakura. A metabolic model describing the H₂O₂ elimination by mammalian cells including H₂O₂ permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes : comparison with experimental data. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1673 :149, 2004.
- [113] J. Sakurai, M. Nagahama, and Y. Fujii. Effet of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on the cardiovascular system of rats. *Infect. Immun.*, 42 :1183, 1983.
- [114] M. Nagahama and J. Sakurai. Effet of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on rat isolated aorta. *Microbiol. Immunol.*, 37 :447, 1993.
- [115] L. Petit, M. Gibert, A. Gouch, M. Bens, A. Vandewalle, and M. R. Popoff. *Clostridium perfringens* epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized mdck cells. *Cellular Microbiology*, 5 :155, 2003.
- [116] M. Nagahama and J. Sakurai. High affinity binding of *Clostridium perfringens* epsilon toxin to rat brain. *Infect. Immunol.*, 60 :1237, 1992.
- [117] S. J. Shortt, R. W. Titball, and C. D. Lindsay. An assessment of the *in vitro* toxicology of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in human and animals cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, 19 :108, 2000.
- [118] A. Soler-Jover, J. Blasi, I. Gomez de Aranda, P. Navarro, M. Gibert, M. R. Popoff, and M. Martin-Satué. Effet of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo. *J. Histochem. Cytochem.*, 52 :931, 2004.
- [119] A. Soler-Jover, J. Dorca, M. R. Popoff, M. Gibert, , J. saura, J. M. Tusell, J. Serratosa, J. Blasi, and M. Martin-Satué. Distribution of *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells. *Toxicon*, 50 :530, 2007.

- [120] L. Petit, M. Gibert, D. Gillet, C. Laurent-Winter, P. Bocquet, and M. R. Popoff. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *J. Bacteriology*, 179 :6480, 1997.
- [121] M. Nagahama, S. Ochi, and J. Sakurai. Assembly of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cell membrane. *J. Natural Toxins*, 7 :291, 1998.
- [122] L. Petit, E. Maier, M. Gibert, M. R. Popoff, and R. Benz. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. *J. Biol. Chem.*, 276 :15736, 2001.
- [123] S. Miyata, O. Matsushita, J. Minami, S. Katayama, S. Shimamoto, and A. Okabe. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. *J. Biol. Chem.*, 276 :13778, 2001.
- [124] A. R. Cole, M. Gibert, M. R. Popoff, D. S. Moss, R. W. Titball, and A. K. Basak. *Clostridium perfringens* epsilon toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat. Struc. Mol. Biol.*, 11 :797, 2004.
- [125] S. Miyata, J. Minami, E. Tamai, O. Matsushita, S. Shimamoto, and A. Okabe. *Clostridium perfringens* epsilon toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 277 :39463, 2002.
- [126] S. J. Singer and G. L. Nicholson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 :720, 1972.
- [127] K. Simons and W. Vaz. Model systems, lipid rafts and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33 :269, 2004.
- [128] M. Edidin. The state of lipid rafts : From model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 32 :257, 2003.
- [129] Y. Sako and A. Kusumi. Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell. Biol.*, 125 :1251, 1994.

- [130] A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two dimensional continuum fluid to the partitioned fluid : high speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34 :351, 2005.
- [131] D. Marquet, P. F. Lenne, H. Rigneault, and H. T. He. Dynamics in the plasma membrane : how to combine fluidity and order. *EMBO*, 0 :1, 2006.
- [132] L. S. Barak and W. W. Webb. Fluorescent low density lipoprotein for observation of dynamics of individual receptor complexes on cultured human fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 90 :595, 1982.
- [133] M. Saxton and K. Jacobson. Single-particle tracking : Applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26 :373, 1997.
- [134] A. Kusumi, Y. Sako, and M. Yamamoto. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.*, 65 :2021, 1993.
- [135] D. Boyer, P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, and M. Orrit. Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science*, 297 :1160, 2002.
- [136] D. Lasne, G. Blab, S. Berciaud, M. Heine, L. Groc, D. Choquet, L. Cognet, and B. Lounis. Single nanoparticle photothermal tracking of 5 nm gold beads in live cells. *Biophys. J.*, 91 :4598, 2006.
- [137] E. A. Reits and J. J. Neefjes. From fixed to FRAP : measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol.*, 3 :145, 2001.
- [138] D. R. Larson, R. E. Thompson, and W. W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.*, 82 :2775, 2002.
- [139] C. Dietrich, B. Yang, T. Fujiwara, A. Kusumi, and K. Jacobson. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys. J.*, 82 :274, 2002.

- [140] M. Tomishige, Y. Sako, and A. Kusumi. Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton. *J. Cell Biol.*, 142 :989, 1998.
- [141] F. Daumas, N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean, and L. Salomé. Confined diffusion without fences of a G-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophys. J.*, 84 :356, 2003.
- [142] R. Simson, E. D. Sheets, and K. Jacobson. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys. J.*, 69 :989, 1995.
- [143] W. P. Jencks and M. Gilchrist. Nonlinear structure-reactivity correlations. the reactivity of nucleophilic reagents toward esters. *J. Am. Chem. Soc.*, 90 :10, 1967.
- [144] E. J. M. Tournier, J. Wallach, and P. Blond. Sulfosuccinimidyl 4-(n-maleimidomethyl)-1-cyclohexane carboxylate as a bifunctional immobilization agent. optimization of the coupling conditions. *Anal. Chem. Acta*, 361 :33, 1998.
- [145] M. J. Gresser and W. P. Jencks. Ester aminolysis. partitioning of the tetrahedral addition intermediate, t^\pm , and the relative leaving ability of nitrogen and oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 99 :21, 1977.
- [146] A. C. Satterthwait and W. P. Jencks. The mechanism of the aminolysis of acetate esters. *J. Am. Chem. Soc.*, 96 :22, 1974.